

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**FUNCIÓN DE DUMBFOUNDED, STICKS AND STONES
Y POLYCHAETOID EN LOS NEFROCITOS EN
GUIRNALDA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER***

TESIS DOCTORAL

SILVIA PRIETO SÁNCHEZ

MADRID, 2009

INDICE DETALLADO	1
1. RESUMEN EN INGLÉS	3
2. ABREVIATURAS	4
3. INTRODUCCIÓN	6
4. OBJETIVOS	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6. RESULTADOS	35
7. DISCUSIÓN	65
8. CONCLUSIONES	76
9. BIBLIOGRAFÍA	78
10. PUBLICACIÓN	86

ÍNDICE

RESUMEN EN INGLÉS	3
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	6
1. Función de Dumbfounded y Sticks and stones en el desarrollo de la musculatura somática	8
1.1. Desarrollo de la musculatura somática	8
1.1.1. Proceso de fusión, características diferenciales entre los mioblastos fundadores y los mioblastos competentes en fusión	9
1.1.2. Proceso de fusión a nivel ultraestructural	10
1.1.3. Proteínas implicadas en el proceso de fusión	11
1.2. Las propiedades de interacción de Duf y Sns median el reconocimiento celular	14
2. Papel funcional de nephrin y NEPH1 en los podocitos de riñón de vertebrados	14
2.1. Estructura del riñón	14
2.2. Diafragma de filtración de los podocitos	17
2.2.1. Proteínas implicadas en el mantenimiento del diafragma de filtración en vertebrados	17
3. Los nefrocitos en guirnalda de <i>Drosophila</i>	19
OBJETIVOS	22
MATERIALES Y METODOS	23
Cepas de moscas	23
Obtención de nuevas deficiencias de <i>duf</i>	24
Inmunohistoquímica	25
Hibridaciones <i>in situ</i> con sondas de ARN-DIG	27
Cultivos celulares y transfección	28
Obtención de extractos de proteínas	28
Inmunoprecipitación	28
Análisis de proteínas transferidas a membrana (“Western blot”)	29
Clonajes	29
Generación de anticuerpos	31
Amplificación por PCR	32
Transformación de embriones por la línea germinal	32
Tratamiento de cubreobjetos con polilisina	33
Degradación de la membrana basal de los nefrocitos en guirnalda larvarios	33
Microscopía electrónica	33
Alimentación de larvas con metales	34
Otros	34
RESULTADOS	35
1. Estudio funcional de Dumbfounded y Sticks and stones en nefrocitos de <i>Drosophila</i>	35
1.1. Patrón de expresión de <i>dumbfounded</i> y <i>sticks and stones</i> en los nefrocitos en guirnalda	35
1.2. Generación de deficiencias <i>dumbfounded</i>	39

1.3. Análisis fenotípico de <i>dumbfounded</i> y <i>sticks and stones</i> en los nefrocitos en guirnalda	42
1.3.1. La función de <i>dumbfounded</i> en nefrocitos no está relacionada con el proceso de fusión	42
1.3.2. Análisis ultraestructural de los nefrocitos en guirnalda durante el desarrollo	43
A) Análisis ultraestructural de los nefrocitos en guirnalda durante el desarrollo en el tipo silvestre	44
B) Análisis ultraestructural de los nefrocitos en guirnalda durante el desarrollo en deficiencias <i>dumbfounded</i>	46
C) Análisis ultraestructural de los nefrocitos en guirnalda durante el desarrollo en condiciones de falta de función de <i>sticks and stones</i>	48
1.3.3. Microscopía electrónica de barrido de los nefrocitos en guirnalda	49
1.3.4. Interdependencia de Duf y Sns para su estabilidad en la membrana	51
1.3.5. Estudio funcional de los nefrocitos en guirnalda en mutantes <i>dumbfounded</i>	52
1.3. Componentes del complejo Duf/Sns en nefrocitos en guirnalda	54
2. Estudio funcional de Polychaetoid en nefrocitos de <i>Drosophila</i>	55
2.1. Asociación de Polychaetoid y Dumbfounded en nefrocitos	57
2.2. Análisis fenotípico del alelo <i>pyd^{lam}</i> en los nefrocitos en guirnalda	58
2.2.1. Análisis ultraestructural de los nefrocitos en guirnalda en el alelo <i>pyd^{lam}</i>	59
2.2.2. Localización de Duf y Sns en nefrocitos <i>pyd^{lam}</i>	62
3. Requerimiento de Dumbfounded en miogénesis	62
DISCUSIÓN	65
1. Las proteínas IRM median distintas funciones dependiendo del contexto celular	66
2. Las proteínas IRM en nefrocitos no median el reconocimiento entre poblaciones celulares distintas	68
3. Función de Duf y Sns durante estadios tempranos del desarrollo de los nefrocitos	69
4. Función de Duf y Sns durante estadios tardíos del desarrollo de los nefrocitos	69
5. Similitud en el desarrollo de los nefrocitos y los podocitos durante estadios tempranos y tardíos	70
6. Polychaetoid interacciona con Duf y es esencial para la formación del diafragma de filtración de los nefrocitos	71
7. Duf y Sns se requieren para la función filtradora de los nefrocitos de <i>Drosophila</i>	73
8. Idoneidad de los nefrocitos de <i>Drosophila</i> como modelo experimental de estudio de los podocitos de vertebrados	73
CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	78

1

RESUMEN EN INGLÉS

Dumbfounded (Duf) and Sticks and stones (Sns) are members of the IRM family of transmembrane proteins in *Drosophila*, that play crucial roles in heterotypic recognition between different cell types. For instance, they mediate the aggregation of founder and fusion competent myoblasts previous to the fusion process and cell arrangements that pattern the *Drosophila* eye. In the present work, we show that Duf and Sns are coexpressed in garland nephrocytes where they form a highly specialized cell junction, the nephrocyte diaphragm, which spans the openings of the nephrocyte's labyrinthine channels. We further show that Duf and Sns are necessary for the development of this diaphragm, as it has also been described for their vertebrate orthologues NEPH1 and nephrin in kidney podocytes. Furthermore, we demonstrate that in nephrocytes Duf and Sns participate in a multiprotein complex that is different to the one that operates during muscle development and that share many of the constituents of the NEPH1/nephrin complex in podocytes. One of these is Polychaetoid, the orthologue of Zonula Occludens-1, which associates with Duf and plays an important role in the formation of nephrocyte diaphragms.

Finally, we show that *Drosophila* nephrocytes exhibit molecular, ultrastructural, and functional similarities to the vertebrate podocytes and suggest that they constitute an excellent experimental model to study the formation, functionality and repair of the podocyte filtration diaphragm during normal development and in pathological conditions.

2

ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido	GCs	Nefrocitos en guirnalda
Ac	Acetato	GFP	Green fluorescent protein (proteína fluorescente verde)
ADN	Ácido desoxirribonucleico	GST	Glutation S-transferasa
<i>ants</i>	<i>antisocial</i>	GuK	Guanilato kinasa
ARN	Ácido ribonucleico	<i>hbs</i>	<i>hibris</i>
ARNi	Ácido ribonucleico interferente	HRP	Horseradish peroxidase
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	Hs	Heat Shock (choque térmico)
BDGP	Berkeley Drosophila Genome	Ig	Inmunoglobulina
β-gal	β-galactosidasa	IRM	Irre Cell Recognition Module
BSA	Albúmina de suero bovino	<i>irreC</i>	<i>irregular chiasm</i>
cols.	Colaboradores	Kb	Kilobases
<i>cycA</i>	<i>ciclina A</i>	<i>kirre</i>	<i>kin of irre</i>
Depc	Dietil-piromcarbonato	<i>lmd</i>	<i>lame duck</i>
Df	Deficiencia	<i>mbc</i>	<i>myoblast city</i>
DIG	Digoxigenina	MCF	Mioblasto competente en fusión
<i>Dmef2</i>	<i>Drosophila myocyte enhancing factor 2</i>	MeOH	Metanol
<i>duf</i>	<i>dumbfounded</i>	MF	Mioblasto fundador
EST	Expressed Sequence Tag	MHC	Myosin heavy chain (Cadena pesada de Miosina)
EtOH	Etanol	<i>minc</i>	<i>myoblast incompetent</i>
<i>eve</i>	<i>even-skipped</i>	<i>N</i>	<i>Notch</i>
FCS	Suero fetal bovino	OR	Oregón-R
FLP	Flipasa recombinasa	Pb	Pares de bases
FNIII	Fibronectina tipo III	PBS	Tampón fosfato salino
FRT	Flipase recombination target (secuencia diana de FLP)	PBT	Tampón fosfato salino + Triton X-100
FuRMAS	<u>F</u> usion- <u>r</u> estricted <u>m</u> yogenic- <u>a</u> dhesive <u>s</u> tructure	PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

PFA	Paraformaldehido
PHM	Primary head mesoderm
PM	Paramiosina
PMSF	Phenylmethilsulfonil fluoride
<i>pros</i>	<i>prospero</i>
<i>pyd</i>	<i>polychaetoid</i>
<i>rols</i>	<i>rolling pebbles</i>
<i>rst</i>	<i>roughest</i>
SF-Ig	Superfamilia de las inmunoglobulinas
SH	Solución de hibridación
SHM	Secondary head mesoderm
<i>sns</i>	<i>sticks and stones</i>
SYG	<u>S</u> ynaptogenesis abnormal
t.a.	Temperatura ambiente
Tam	Tamou
Tris	Tris-hidroximetil- aminometano
UAS	Upstream activation sequence
<i>w</i>	<i>white</i>
WT-1	Wilms tumor 1
<i>y</i>	<i>yellow</i>
ZO-1	Zonula occludens 1

3

INTRODUCCIÓN

La Biología del Desarrollo estudia la formación de organismos pluricelulares a partir de una única célula, el cigoto, lo que implica una regulación espacial y temporal muy compleja de distintos procesos celulares como división, diferenciación, adhesión, migración y muerte celular, que se consigue mediante la activación diferencial de determinados genes a lo largo del desarrollo.

El uso de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, como modelo animal de experimentación tiene muchas ventajas como son: tiempo de generación corto, gran progenie, relativamente baja complejidad génica ($1,2 \times 10^8$ pb) y fundamentalmente el desarrollo de técnicas genéticas muy sofisticadas que le dan una ventaja sobre otros organismos experimentales. La mayoría de la información acumulada a lo largo de ocho décadas de utilización de *Drosophila* como organismo modelo se halla disponible en bases de datos que son compartidas por la comunidad científica. Además, el alto grado de conservación de las secuencias codificantes entre *Drosophila* y otros organismos (incluyendo a los humanos), ha aumentado significativamente su utilización como modelo experimental en estudios biomédicos.

En nuestro laboratorio estamos interesados en el desarrollo del tejido muscular. Los músculos de *Drosophila* y de los vertebrados son multinucleados y se forman por fusión de células de origen mesodérmico denominadas mioblastos. En *Drosophila* la fusión ocurre entre dos poblaciones diferentes de mioblastos: los fundadores (MF) y los competentes en fusión (MCF). En el reconocimiento y atracción de los mioblastos juegan un papel esencial proteínas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (SF-Ig), como son Dumbfounded (Duf) también llamada Kin of irre (Kirre), que es una proteína específica de mioblastos fundadores y Sticks and stones (Sns) que es específica de mioblastos competentes en fusión. La

agregación de mioblastos competentes en fusión y fundadores depende de las propiedades de reconocimiento heterotípico entre ambas proteínas y garantiza la direccionalidad del proceso de fusión, de modo que la fusión ocurre siempre entre mioblastos pertenecientes a distintas poblaciones.

En este trabajo hemos establecido que Duf y Sns se coexpresan en otro derivado mesodérmico, los nefrocitos de *Drosophila*. En la mosca existen dos tipos de nefrocitos, las células pericárdicas y los nefrocitos en guirnalda, del inglés “garland cells”. Estas células reciben su nombre por su localización en ristra alrededor del esófago y nos vamos a referir también a ellas mediante las siglas: GCs (garland cells). La función de los nefrocitos en invertebrados es regular la composición de la hemolinfa retirando los productos tóxicos gracias a su gran capacidad endocítica. Decidimos estudiar el papel funcional que poseen Duf y Sns en los nefrocitos en guirnalda porque el único tipo celular descrito en el que se coexpresan ambos tipos de proteínas SF-Ig es en los podocitos renales de vertebrados. Resulta muy interesante que la función de los podocitos sea mantener el balance de los niveles de agua y electrolitos y eliminar toxinas durante el proceso de ultrafiltrado de la sangre, evitando la pérdida de proteínas en la orina y que para ello sea importante que haya una barrera de filtración que determine el tamaño de las moléculas que pasan de la sangre a la orina. Esta barrera de filtración se encuentra en los glomérulos del riñón y en ella tiene un papel principal el diafragma de filtración, formado por un complejo multiprotéico en el que participan las proteínas SF-Ig: NEPH1 y nephrin, ortólogos de Duf y Sns respectivamente. Mutaciones en los genes que codifican para ambas proteínas dan lugar a una disrupción de la barrera de filtración y al paso de proteínas de la sangre a la orina (proteinuria), lo que provoca fallos renales que resultan en letalidad.

En este trabajo mostramos que en los nefrocitos de *Drosophila*, Duf y Sns son parte integrante de un complejo multiprotéico distinto al que opera durante en proceso de fusión y forman un diafragma ultraestructuralmente similar al diafragma de filtración renal. En este complejo participan proteínas ortólogas a las que forman el diafragma de filtración en vertebrados. La homología entre ambas células especializadas, nefrocitos y podocitos, se extiende al nivel funcional, ya que en ambos casos el diafragma de filtración es una barrera necesaria para el ultrafiltrado de la hemolinfa y sangre respectivamente. Además, al igual que ocurre en vertebrados, en ausencia de Duf ó Sns el diafragma de filtración no se forma y trae como consecuencia una alteración en la composición de la hemolinfa. Por todo ello, proponemos que los nefrocitos en guirnalda son un buen modelo experimental para abordar el estudio de la formación y función del diafragma de filtración de los podocitos del riñón de vertebrados, así como para el estudio de patologías derivadas de su disfunción.

En la introducción se explica primero el papel de Duf y Sns durante la formación de los músculos de *Drosophila*, a continuación, se expone de forma breve lo que se ha estudiado de la función de NEPH1 y nephrin en los podocitos del riñón de vertebrados, y por último, se describe lo que se sabía hasta ahora de los nefrocitos en guirnalda de *Drosophila melanogaster*.

1. FUNCIÓN DE DUMBFOUNDED Y STICKS AND STONES EN EL DESARROLLO DE LA MUSCULATURA SOMÁTICA

1.1. Desarrollo de la musculatura somática

Drosophila es un insecto holometábolo que tras una fase embrionaria y tres larvarias sufre un proceso de metamorfosis en el cual se degradan la mayoría de los tejidos larvarios y tiene lugar su sustitución por las estructuras adultas. Por lo tanto, a lo largo de su vida tiene lugar la formación de dos sistemas musculares diferentes, el embrionario-larvario y el adulto. En *Drosophila* todas las células que darán lugar a los distintos derivados musculares provienen de la capa embrionaria mesodérmica (Bate, 1993).

El patrón muscular de la larva de *Drosophila melanogaster* está formado por 30 músculos sincitiales por hemisegmento abdominal. A pesar de que todas las fibras musculares poseen unas características fisiológicas y estructurales comunes, cada músculo es perfectamente identificable por una serie de características como son el tamaño, la orientación, la posición, el lugar de anclaje a la epidermis, la inervación y su patrón de expresión génica (Bate, 1993). Sin embargo, a pesar de la simplicidad relativa del patrón final, para llegar a su formación el sistema ha de completar un complejo programa miogénico que de cuenta de cómo un conjunto de células en principio equivalentes (las células del mesodermo), dan lugar a distintas fibras multinucleadas con características muy definidas (Figura 1).

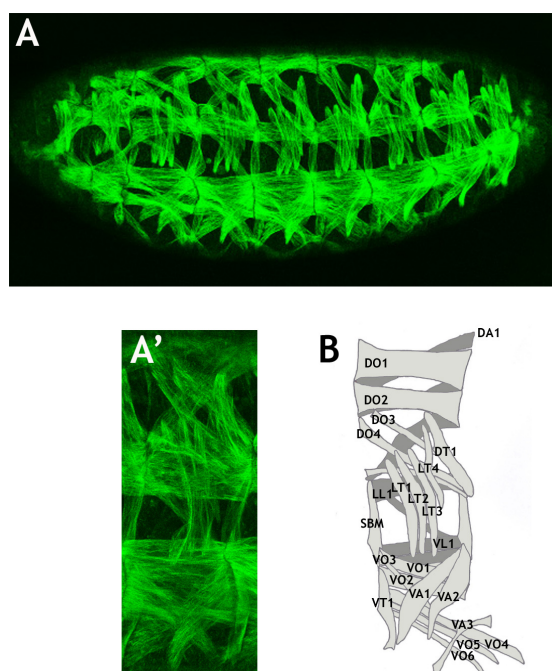


Figura 1.- Patrón muscular de la larva de *Drosophila*. (A, A') Patrón muscular de un embrión de estadio 17 revelado por la expresión de la proteína fluorescente GFP bajo el control del promotor del gen de la cadena pesada de la miosina muscular (MHC). (B) Representación esquemática del patrón muscular larvario de un hemisegmento abdominal tipo, en el que se indica por su acrónimo cada uno de los 30 músculos del patrón. DO (dorsal oblicuo), DA (dorsal agudo), DT (dorsal transversal), LL (lateral longitudinal), LT (lateral transversal), VL (ventral longitudinal), VO (ventral oblicuo), VA (ventral agudo) SBM (músculo del borde segmental).

1.1.1. Proceso de fusión, características diferenciales entre los mioblastos fundadores y los mioblastos competentes en fusión

El desarrollo muscular se inicia durante el estadio 11 embrionario, en el que grupos de células equivalentes del mesodermo adquieren competencia miogénica (Carmena y cols., 1995; Carmena y cols., 1998a). Mediante un proceso de inhibición lateral mediado por la vía de señalización de Notch, sólo un mioblasto por grupo será seleccionado como progenitor muscular (Bate y cols., 1993). El progenitor sufre una división asimétrica mediante la cual se forman ó dos mioblastos fundadores (MF), que inician el desarrollo de músculos larvarios, ó un mioblasto fundador y un progenitor de músculo adulto (Ruiz-Gómez y Bate, 1997; Carmena y cols., 1998b), el cual permanece indiferenciado durante embriogénesis y hasta segundo estadio larvario en el que iniciará la fase proliferativa anterior a la formación de músculos adultos (Bate y cols., 1991). El resto de los mioblastos que no son seleccionados como progenitor se denominan mioblastos competentes en fusión (MCF). Tenemos de este modo dos poblaciones diferentes de mioblastos: los fundadores y los competentes en fusión.

Ambas poblaciones se diferencian en patrones de expresión génica y también en comportamiento celular. Así, cada mioblasto fundador expresa una combinación única de factores de transcripción. Cuando los MCF se fusionan con los MF son reprogramados, adoptando los patrones de expresión génica de los MF a los que se fusionan. De este modo, el mioblasto fundador es el que prefigura las características del futuro músculo al que dará

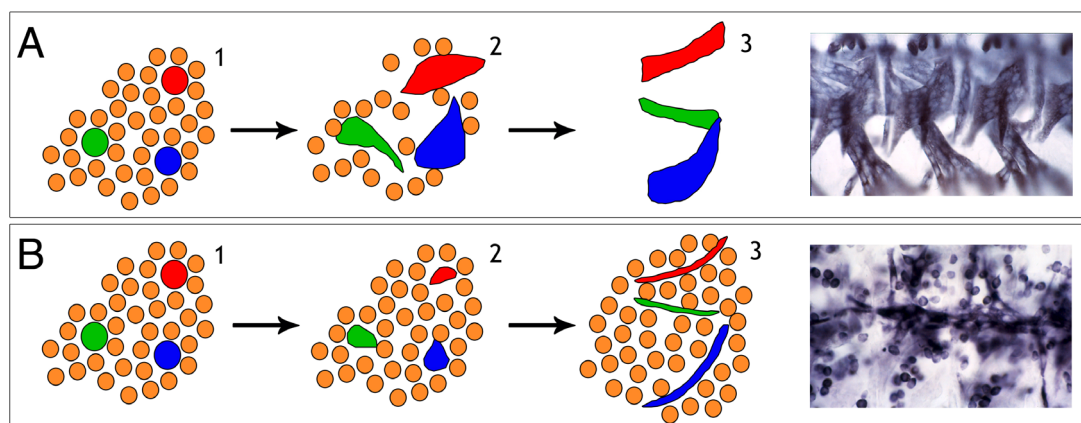


Figura 2.- Representación esquemática de las poblaciones de mioblastos. (A) Los mioblastos fundadores (MF) adquieren su identidad (representada por círculos rojo, azul y verde) durante el proceso de segregación local que ocurre en el mesodermo miogénico y que también define la población de mioblastos competentes en fusión (MCF, círculos naranjas)(1). La fusión de MCF con MF produce células sincitiales denominadas precursores musculares, en los que todos los núcleos se reespecifican según la identidad del MF (2), que se mantiene en el músculo maduro (3). Se muestra un detalle de los músculos embrionarios ventrales teñidos con un anticuerpo contra la MHC. **(B)** En mutantes en los que no se produce fusión, la segregación y especificación de MF no se afecta (1). En ausencia de fusión sólo los MF diferencian dando lugar amiotubos mononucleados funcionales que mantienen la identidad del MF (2,3). La expresión de MHC en mutantes de fusión revela la diferencia morfológica entre ambas poblaciones de mioblastos: los MF son alargados y se insertan en los tendones, mientras que los MCF permanecen redondeados.

lugar como posición, orientación, tamaño, sitios de anclaje al ectodermo e innervación (Bate y Rushton, 1993). De hecho, en fondos mutantes en los que no se produce fusión, los mioblastos fundadores se diferencian dando lugar a miotubos mononucleados funcionales que salvo el tamaño, adquieren las propiedades típicas del músculo maduro. Mientras que la población de mioblastos competentes en fusión no completa miogénesis en ausencia de fusión y es eliminada por los macrófagos (Rushton y cols., 1995), (Figura 2).

1.1.2. Proceso de fusión a nivel ultraestructural

El proceso de fusión es complejo y ha sido descrito a nivel ultraestructural con sumo detalle (Doberstein y cols., 1997). De esta forma todo el proceso ha podido ser dividido en 4 etapas consecutivas: reconocimiento celular, adhesión, alineamiento y fusión de mioblastos (Figura 3). El proceso de segregación local de mioblastos fundadores define las posiciones en las que se iniciará la fusión de éstos con mioblastos competentes en fusión de zonas adyacentes. En la primera etapa se establece el contacto entre ambos tipos de mioblastos. Los mioblastos competentes en fusión juegan un papel activo en el reconocimiento de los mioblastos fundadores mediante la emisión de filopodios. Cuando los mioblastos entran en contacto se adhieren y tiene lugar la formación del complejo de prefusión que se visualiza como un conjunto de vesículas apareadas a ambos lados de las membranas que se van a fusionar. Este complejo evoluciona

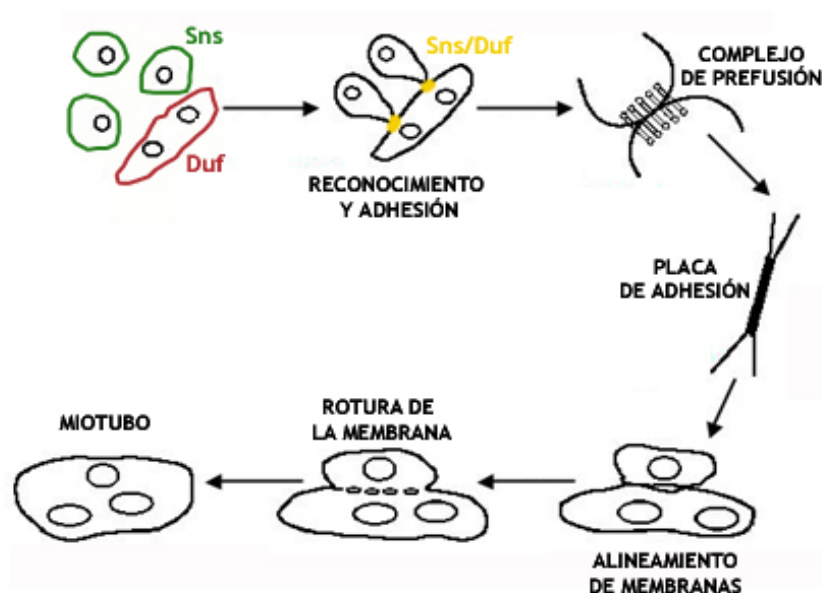


Figura 3.- Proceso de fusión a nivel ultraestructural. Esquema en el que se representan las diferentes etapas del proceso de fusión observadas por técnicas de microscopía electrónica. La primera etapa es el reconocimiento y adhesión de los mioblastos. Duf (rojo) se expresa en mioblastos fundadores y miotubos en formación y Sns (verde) en mioblastos competentes en fusión. Cuando las células agregan Duf y Sns se acumulan en los puntos de contacto (amarillo). En la siguiente etapa se observan unas vesículas a ambos lados de las membranas que forman el complejo de prefusión. Estas se resuelven en zonas densas a los electrones denominadas placas de adhesión. Posteriormente las membranas se alinean y se rompen dando lugar al miotubo multinucleado.

dando lugar a una zona de material denso a los electrones, denominada placa de adhesión, que facilita la elongación y alineamiento de ambos mioblastos, paso previo a la formación de poros entre las membranas apuestas que termina en la fusión celular.

1.1.3. Proteínas implicadas en el proceso de fusión

Se han identificado genes que codifican para proteínas relevantes en las diferentes etapas de la fusión. Hay proteínas que median en la atracción y adhesión entre las dos poblaciones de mioblastos, otras encargadas de la transducción de la señal al citoplasma, reordenamiento de los componentes del citoesqueleto y en la formación del complejo de prefusión (Doberstein y cols., 1997; Kesper y cols., 2007; Richardson y cols., 2008a; Richardson y cols., 2008b).

Por su relación con el trabajo realizado en esta Tesis, vamos a introducir con más detalle las proteínas que median el reconocimiento celular. Son cuatro proteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (SF-Ig) a las que recientemente se les ha denominado proteínas IRM, del inglés “Irre Cell Recognition Module” (Fischbach y cols., 2009). Son proteínas de membrana con una región extracelular que incluye varios dominios de inmunoglobulina (Ig), una única zona transmembrana y un dominio citoplasmático. Cada dominio Ig contiene dos residuos de cisteína que forman un enlace disulfuro intracatenario que permite su plegamiento independiente. Los dominios Ig son del tipo V y C2, característicos de proteínas que median adhesiones célula-célula e interacciones célula-matriz. Las proteínas IRM

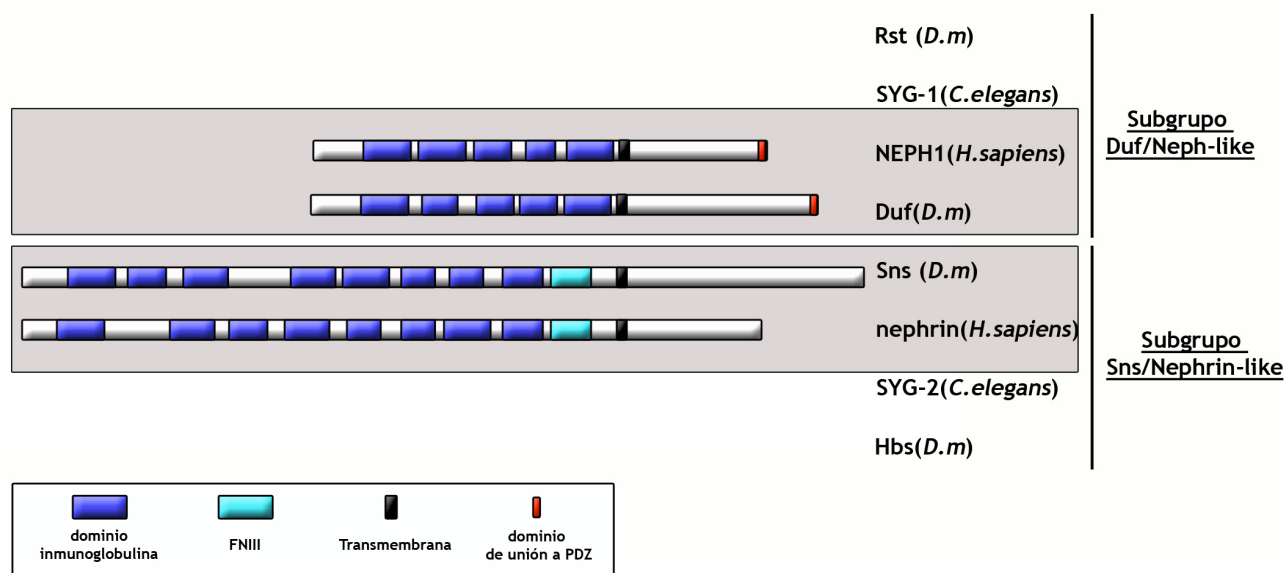


Figura 4.- Clasificación de las proteínas IRM. Las proteínas IRM pertenecen a la SF-Ig y son proteínas de membrana con una única zona transmembrana y un dominio citoplasmático relativamente corto. Se subdividen en dos subgrupos en razón a la extensión y composición de la región extracelular. Al subgrupo Duf/Neph-like, pertenecen: SYG-1, Rst, NEPH1 y Duf, que tienen cinco dominios Ig (azul oscuro). A la izquierda en el recuadro gris superior, se representan esquemáticamente Duf y NEPH1, incluyendo un dominio conservado de unión a PDZ (rojo). Al subgrupo Sns/Nephrin-like, pertenecen SYG-2, Hbs, nephrin y Sns, que tienen 8-9 dominios Ig y uno fibronectina tipo III (FNIII) (azul claro). En el recuadro gris inferior se encuentran representados los dominios de Sns y nephrin. (*D.m*; *Drosophila melanogaster*).

se subdividen en dos grupos según la extensión y composición de su región extracelular. En *Drosophila*, Duf/Kirre (Ruiz-Gómez y cols., 2000; Strunkelnberg y cols., 2001) y su parálogo Roughest (Rst), también llamado Irregular Chiasm C (IrreC) (Ramos y cols., 1993), pertenecen al subgrupo más corto (Duf/Neph-like) y constan de cinco dominios de inmunoglobulina en su región extracelular. Este subgrupo incluye otros ortólogos de Duf, como *SYG-1* en el nematodo *C. elegans* (Shen y Bargmann, 2003) y NEPH1-4 en humanos (Sellin y cols., 2003). Las otras dos proteínas IRM de *Drosophila*, Sns (Bour y cols., 2000; Kocherlakota y cols., 2008) y su parálogo Hibris (Hbs) (Artero y cols., 2001; Dworak y cols., 2001) pertenecen al subgrupo más largo (Sns/Nephrin-like) y constan de 8-9 dominios de inmunoglobulina y uno fibronectina tipo III (FNIII) en su región extracelular. A este subgrupo pertenecen *SYG-2* en *C. elegans* (Shen y cols., 2004) y nephrin en humanos (Kestila y cols., 1998) (Figura 4).

Estas cuatro proteínas SF-Ig están implicadas en el reconocimiento celular entre ambas poblaciones de mioblastos. Duf es específica de mioblastos fundadores, Sns y Hbs de competentes en fusión, mientras que Rst se encuentra en ambas poblaciones. El fenotipo obtenido tanto en ausencia de *sns*, como de *duf* y *rst* (*Df(1)w^{67k30}*), consiste en un bloqueo completo de la fusión de mioblastos (Ruiz-Gómez y cols., 2000; Bour y cols., 2000). Lo más llamativo de este fenotipo, que permitió identificar a las proteínas SF-Ig como mediadoras de

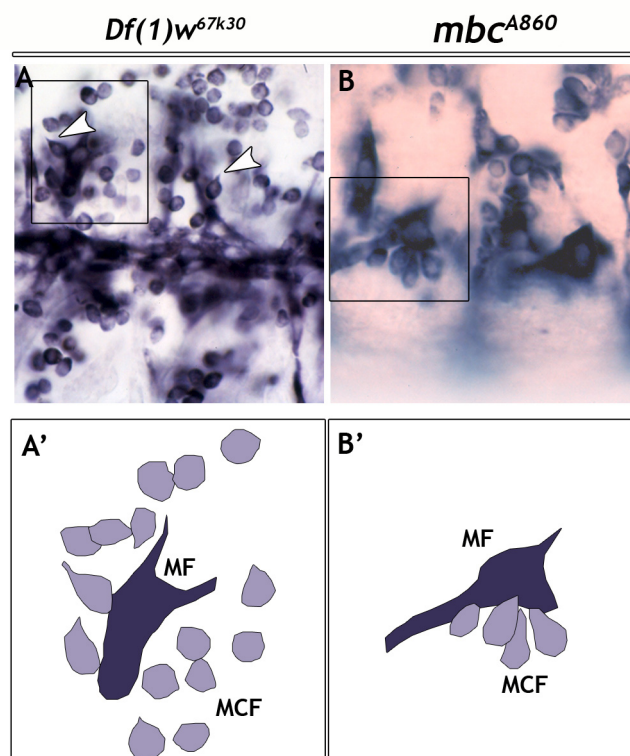


Figura 5.- Fallo en la agregación de mioblastos en mutantes *rst duf*. (A) Detalle de un embrión *Df(1)w^{67k30}* (*rst, duf*) en estadio 16 teñido con anti-MHC mostrando la falta de agregación de los MCF (representados en violeta en A') sobre los MF (morado en A'). Observar la dispersión de los FCM y la presencia de filopodios, orientados al azar (puntas de flecha). (B) Detalle de la misma región de un embrión mutante en *mbc*, un gen requerido en fusión que no afecta la etapa de reconocimiento de mioblastos. En este caso se observa la formación de agregados de mioblastos que incluyen un MF y varios MCF (representado esquemáticamente en B').

reconocimiento celular, es que en estos embriones no se observan agregados de mioblastos, como si ocurre en mutaciones para genes requeridos en etapas subsecuentes del proceso de fusión (Erickson y cols., 1997) (Figura 5).

Recientemente se ha descrito que en los puntos de contacto entre los mioblastos competentes en fusión y los fundadores, las proteínas SF-Ig forman una estructura en forma de anillo alrededor de filamentos de F-actina denominada FuRMAS (Fusion-restricted myogenic-adhesive structure) (Kesper y cols., 2007). Alrededor de las FuRMAS se van a organizar proteínas que son necesarias para llevar a cabo la fusión. Uno de los componentes de las FuRMAS es la proteína adaptadora Rolling pebbles (Rols7) (Menon y Chia, 2001), también conocida como antisocial (Ants) (Chen y Olson, 2001), una proteína citoplasmática específica de mioblastos fundadores, que se transloca a la membrana por interacción con Duf. Por su asociación con componentes del citoesqueleto como Myoblast city (Mbc) (Erickson y cols., 1997) y D-Titina (Machado y Andrew, 2000; Zhang y cols., 2000; Hakeda y cols., 2000), se ha propuesto que Rols funcionaría como un adaptador, transmitiendo señales desde la membrana al citoesqueleto. Las etapas siguientes del proceso de fusión implican una reorganización dinámica del citoesqueleto de actina en la que intervienen las proteínas Kette, WASP, WAVE, Wip y Arp2/3 (Berger y cols., 2008; Richardson y cols., 2007; Massarwa y cols., 2007) (Figura 6).

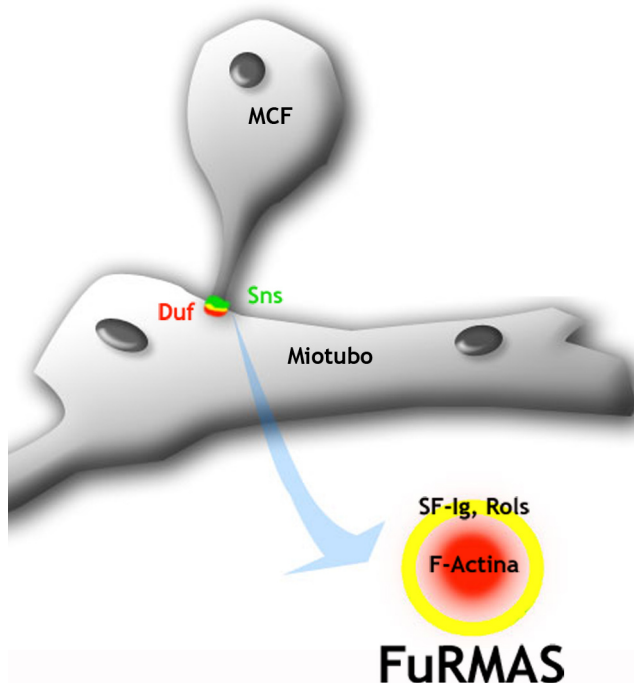


Figura 6.- Representación esquemática del complejo de adhesión (FuRMAS). En los sitios de contacto entre los MF (y miotubos en formación) y los MCF se concentran las proteínas SF-Ig Duf (rojo) y Sns (verde) formando un anillo (amarillo). En respuesta a esta interacción heterotípica, el adaptador Rols se recluta al complejo en el MF/ miotubo (flecha). El citoesqueleto se reorganiza en esta zona donde se observan haces de filamento de actina en la zona interna del anillo (rojo).

1.2. Las propiedades de interacción de Duf y Sns median el reconocimiento celular

Las propiedades de interacción de Duf y Sns han sido estudiadas en células Schneider (S2) de *Drosophila*. Así, se ha descrito que tanto Duf como Rst, pero no Sns, son capaces de mediar adhesión homotípica en trans en células S2 (Galletta y cols., 2004). Cuando las células que expresan Duf ó Rst se agregan, las proteínas se acumulan en las zonas de contacto celular. También se ha comprobado que cuando se producen interacciones heterotípicas entre Sns y Duf ambas proteínas se acumulan en las zonas de contacto y que éstas interacciones heterotípicas son favorecidas sobre las homotípicas (Dworak y cols., 2001; Galletta y cols., 2004). Las zonas extracelulares tanto de Duf como de Sns son suficientes para producir la agregación tanto homotípica Duf/Duf como heterotípica Duf/Sns (Galletta y cols., 2004; Menon y cols., 2005). También se han hecho estudios usando células S2 para comprobar la interacción de Rols con Duf. Así, en células cotransfectadas con Rols y Duf, la localización de Rols depende del estado de agregación celular. Si las células están dispersas, Rols permanece en el citoplasma y Duf en la membrana. Es necesario que ocurra una interacción Duf/Duf ó Duf/Sns, para que las células se agreguen y se produzca la translocación de Rols del citoplasma a la membrana en la zona de contacto celular. La translocación requiere que la proteína Duf esté integra (sólo el dominio extracelular ó intracelular no es capaz de llevar Rols a la membrana), por lo que se ha sugerido que la interacción del dominio extracelular provoca un cambio conformacional en Duf que hace posible, ahora si, la unión de Rols. (Menon y cols., 2005).

2. FUNCIÓN DE NEPH1 Y NEPHRIN EN LOS PODOCITOS DEL RIÑÓN DE VERTEBRADOS

Hasta ahora hemos visto que se conocía de la funcionalidad de Duf y Sns en la formación del músculo somático de *Drosophila*. Ahora vamos a introducir brevemente que se conoce de sus proteínas ortólogas NEPH1 y nephrin y su función en los podocitos del riñón.

2.1. Estructura del riñón

La nefrona es la unidad funcional del riñón y está formada por el glomérulo y el túbulo urinífero. Los riñones son los encargados de la producción de la orina cuya composición final resulta del proceso de filtración de la sangre que tiene lugar en el glomérulo y de la reabsorción en los túbulos, de la mayoría de las proteínas que son filtradas. El glomérulo es un sofisticado filtro que permite el paso del agua y pequeños solutos desde la sangre al espacio urinario (cápsula de Bowman), reteniendo el paso de la albúmina y proteínas de mayor tamaño. Contiene una red capilar rodeada por el espacio urinario, y es entre ellos donde se encuentra la barrera de filtración que se compone de: epitelio fenestrado de los vasos sanguíneos, membrana basal

glomerular y células epiteliales viscerales, llamadas también podocitos. Los podocitos son células especializadas que constan de un cuerpo celular suspendido en el espacio de Bowman y unas prolongaciones primarias que a su vez se ramifican dando lugar a los pedicelos, que se interconectan entre ellos y con los pedicelos de podocitos vecinos, formando una capa continua que rodea por completo a los capilares del glomérulo (Figura 7 y 8). Esta interconexión es una unión célula-célula altamente especializada, llamada diafragma de filtración. De esta forma el filtrado pasa a través de las fenestraciones del endotelio de los capilares sanguíneos, de la membrana basal y por último atraviesa los diafragmas de filtración, hasta llegar al espacio urinario o cápsula de Bowman (Figura 8).

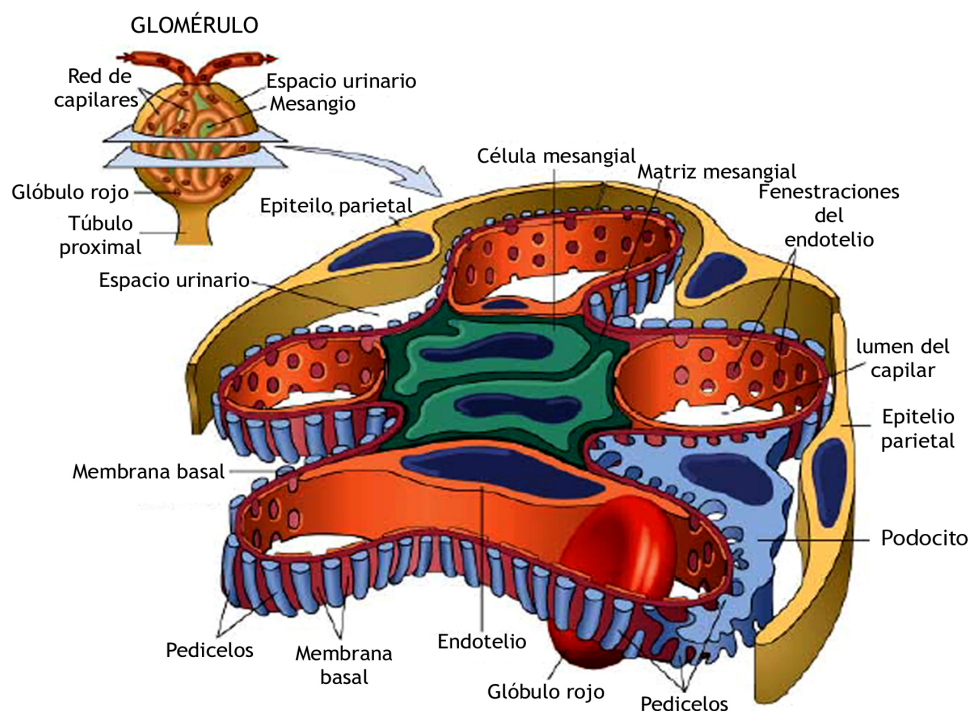


Figura 7.- Estructura del glomérulo renal. Esquema modificado de “Robbins and Cotran, pathologic basis of disease”(Kumar V., 2004). Se muestra una ampliación de un corte transversal del glomérulo. Los vasos sanguíneos están representados en naranja y se encuentran rodeados por las células del epitelio visceral denominadas podocitos (color azul). Estas tienen un cuerpo celular grande y multitud de extensiones (pedicelos) que envuelven a los capilares. Entre el endotelio del vaso sanguíneo y los pedicelos se encuentra la membrana basal glomerular (rojo). El espacio que queda entre los pedicelos y el epitelio parietal (amarillo) se denomina espacio urinario.

El papel de las células del endotelio glomerular ha sido poco estudiado debido a la dificultad que existía para su cultivo dada su pobre capacidad de replicación y a la ausencia de líneas celulares representativas disponibles. Recientemente se ha estudiado el papel del glicocalix de las células del endotelio en la restricción del paso de proteínas de la sangre (Singh y cols., 2007; Satchell y Braet, 2009).

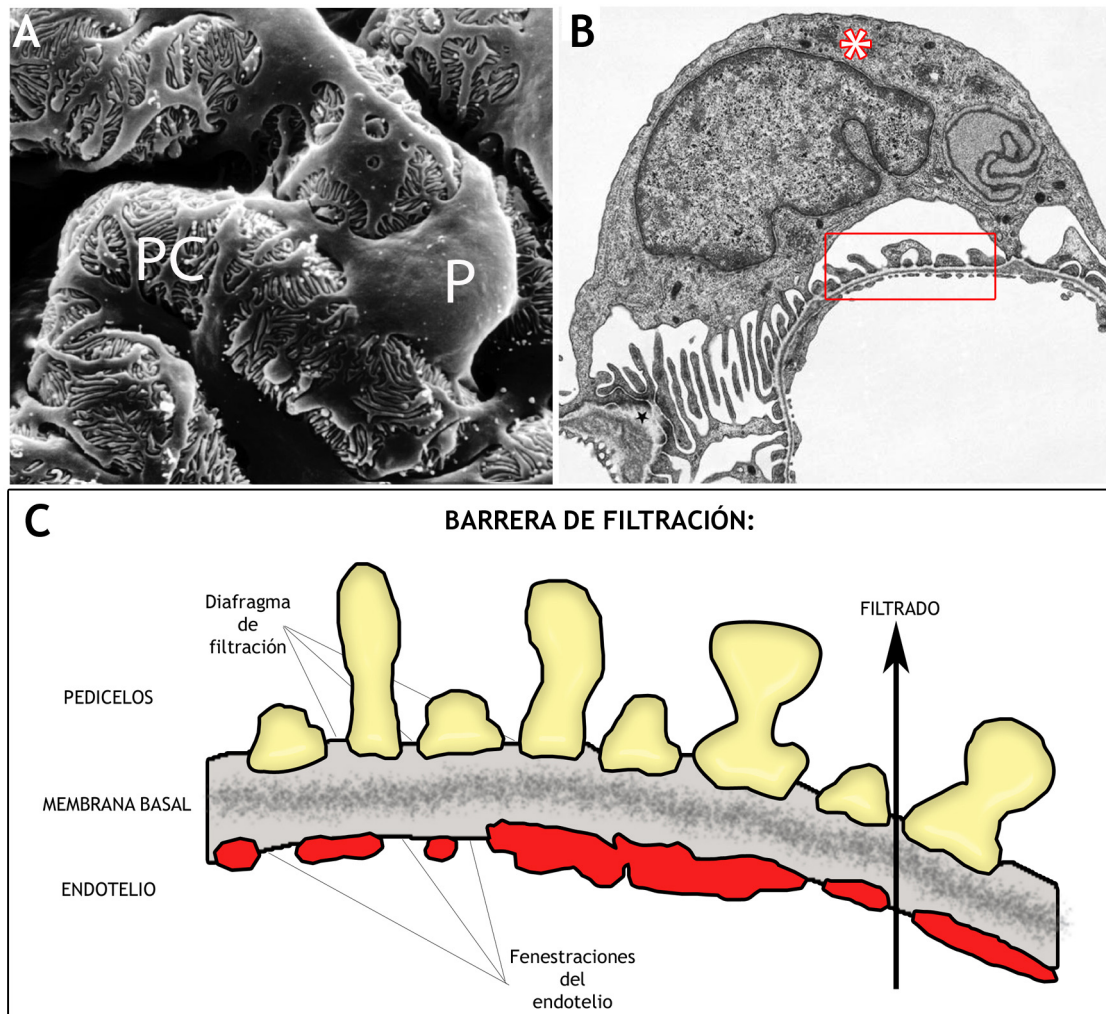


Figura 8.- Composición de la barrera de filtración. (A, B) Micrografías de microscopía electrónica de barrido (A) y transmisión (B) tomadas de “cell biology of the glomerular podocyte” (Pavenstädt y cols., 2003). (A) Imagen de podocitos (P) cuyas prolongaciones celulares (PC) forman una red que envuelve completamente a los capilares sanguíneos. (B) Micrografía de una sección transversal del glomérulo que muestra el cuerpo celular de un podocito (*) y detalle de la barrera de filtración (zona encuadrada), representada esquemáticamente en C. (C) Esquema en el que se indican las tres capas de la barrera de filtración: las fenestraciones del endotelio del vaso sanguíneo (rojo) por las que pasa el filtrado (flecha), la membrana basal glomerular (gris) y los pedicelos de los podocitos (amarillo) que forman los diafragmas de filtración.

La membrana basal glomerular fue descrita en primer lugar como determinante en regular el tamaño y carga de las macromoléculas del filtrado. Su principal componente es el colágeno tipo IV que forma una red tridimensional sobre la que se unen lamininas y proteoglicanos (Tryggvason y Wartiovaara, 2001). Ahora se sabe que el papel de los podocitos y del diafragma de filtración son claves en la elaboración de una orina libre de proteínas y algunos autores han pasado a considerar a la membrana basal como un prefiltro. Sin embargo, hay trabajos recientes que describen que la falta de laminina beta2 (LAMB2) de la membrana basal en ratones, hace que se desarrolle proteinuria poco después del nacimiento (Jarad y cols., 2006). Por lo que hay autores que defienden que la membrana basal tiene una importancia decisiva en la formación de un ultrafiltrado libre de proteínas (Farquhar, 2006).

2.2. Diafragma de filtración de los podocitos

El último componente de la barrera de filtración lo constituyen los podocitos cuyas prolongaciones celulares se interconectan entre sí formando una unión intercelular muy especializada denominada diafragma de filtración. Ultraestructuralmente, el diafragma de filtración se observa como una línea densa a los electrones que se localiza entre los pedicelos del podocito justo por encima de la membrana basal (representada esquemáticamente en Figura 9).

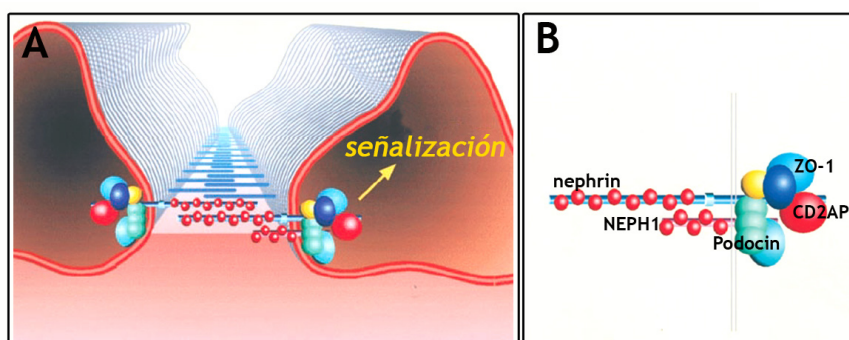


Figura 9.- Representación esquemática del diafragma de filtración de los podocitos del riñón de vertebrados. Imagen modificada de “Signaling at the Slit Diaphragm” (Benzing, 2004). (A) Diafragma de filtración y complejo de proteínas asociadas a este. Las proteínas SF-Ig NEPH1 y nephrin reclutan proteínas adaptadoras que inician y regulan diferentes vías de señalización. (B) Detalle ampliado de algunas de las proteínas principales que se asocian a NEPH1 y a nephrin, como son CD2AP, Podocina y ZO-1.

Desde que en 1998 se identificó a nephrin como primer componente estructural del diafragma de filtración (Kestila y cols., 1998), se han identificado una serie de proteínas que forman parte del complejo multiprotéico que definen al diafragma de filtración, entre ellas: NEPH1, CD2AP, podocina, y Zonula Ocludens (ZO-1) (Garg y cols., 2007). NEPH1 y nephrin tienen un papel en el mantenimiento de la estructura del diafragma, regulando el tamaño del filtrado y además participando en vías de señalización necesarias para mantener la integridad del podocito, como reordenamiento del citoesqueleto, muerte celular, polarización, endocitosis y proliferación (Benzing, 2004).

2.2.1. Proteínas implicadas en el mantenimiento del diafragma de filtración en vertebrados

En el mantenimiento del diafragma de filtración intervienen proteínas de la SF-Ig que se localizan en la membrana y proteínas citoplasmáticas que interaccionan con la zona intracelular de estas proteínas. Entre las proteínas de la SF-Ig se encuentran NEPH1 y nephrin que son las ortólogas a las proteínas de *Drosophila* Duf y Sns respectivamente.

La primera proteína que se descubrió que estaba implicada en el mantenimiento estructural de los diafragmas de filtración de los podocitos del glomérulo fue nephrin (Kestila y cols., 1998). Mutaciones en el gen NEPHS1, que codifica para la proteína nephrin, produce en humanos un síndrome llamado síndrome nefrótico congénito tipo finlandés. Los pacientes que lo sufren pierden el diafragma de filtración y padecen una intensa proteinuria en útero muriendo en los dos primeros años de vida por fallos renales. El único tratamiento es el trasplante de riñón.

Se sabe que nephrin puede interaccionar homotípicamente dando lugar a la adhesión de células en cultivo de riñón HEK293 dejando un espacio entre las células de 40-50nm al igual que el de los diafragmas de filtración (Khoshnoodi y cols., 2003). Por otro lado, NEPH1 colocaliza con nephrin en los podocitos y se ha comprobado que los dominios intracelulares de ambas interaccionan heterotípicamente. Además, los dominios extracelulares y los intracelulares de NEPH1 interaccionan homotípicamente (Barletta y cols., 2003; Liu y cols., 2003).

El papel funcional de NEPH1 y nephrin también se estableció en modelos de ratón donde la inyección de anticuerpos contra ambas proteínas da lugar a proteinurias (Liu y cols., 2003), y donde la ausencia de NEPH1 en ratones de tres semanas conlleva a alteraciones en la estructura del diafragma de filtración y proteinurias (Donoviel y cols., 2001) (Figura 10).

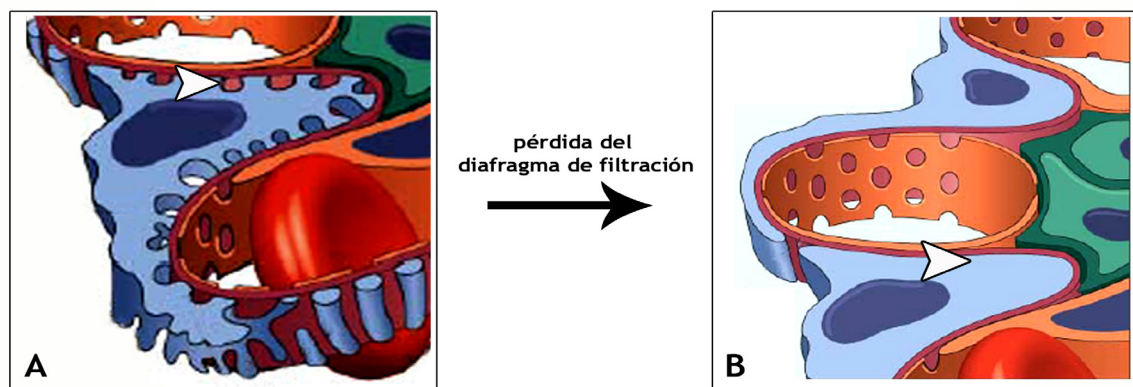


Figura 10.- Pérdida del diafragma de filtración en patologías renales. Esquema modificado de (Kumar V., 2004) "Robbins and Cotran pathologic basis of disease". **(A)** Diafragma de filtración en condiciones normales en las que los podocitos forman los pedículos que rodean a los vasos sanguíneos (punta de flecha blanca). **(B)** El bloqueo o eliminación de NEPH1 ó nephrin conlleva a la desintegración de la estructura de los pedículos con pérdida del diafragma de filtración (punta de flecha blanca).

La zona intracelular de NEPH1 interacciona con Zonula Occludens-1 (ZO-1). ZO-1 es miembro de la familia de proteínas MaGUK (guanilato kinasa asociado a membrana) y interacciona con otras proteínas mediante los 3 dominios PDZ y su dominio SH3. La interacción con NEPH1 fue demostrada mediante técnicas de coimmunoprecipitación y se produce entre el dominio de unión a PDZ de NEPH1 (los 3 últimos aminoácidos del extremo carboxiterminal,

THV) y el primer dominio PDZ de ZO-1. Esta unión parece estar regulada por el estado de fosforilación del dominio de unión a PDZ, de forma que la fosforilación de la Treonina impide su unión a ZO-1 (Huber y cols., 2003). ZO-1 organizaría el complejo NEPH1 favoreciendo el reclutamiento de componentes del citoesqueleto de actina (Fanning y cols., 2002).

Se han encontrado también diversas proteínas que interaccionan con el dominio intracelular de nephrin como son CD2AP y podocina. Mutaciones en podocina provocan el síndrome nefrótico familiar corticorresistente. Pertenece a la familia de las estomatinas y se ha comprobado en estudios con células HEK293 que puede aumentar la señalización de nephrin. podocina se localiza en los dominios de lípidos raft e interacciona con nephrin y CD2AP, reclutando a ambas a los microdominios raft de membrana (Schwarz y cols., 2001; Huber y cols., 2001). CD2AP tiene dominios SH3 y sirve de anclaje al citoesqueleto de actina, también participa en la regulación de la vía endocítica. Ratones mutantes para CD2AP pierden la estructura de los pedicelos y se produce proteinuria (Wolf y Stahl, 2003).

3. LOS NEFROCITOS EN GUIRNALDA DE DROSOPHILA

Ya hemos visto el papel que tienen Duf y Sns en el músculo de *Drosophila* y el de sus proteínas ortólogas en los podocitos de riñón. A continuación resumiré que se conoce de los nefrocitos en guirnalda de *Drosophila*.

En la mosca existen dos tipos diferentes de nefrocitos, las células pericárdicas y las “garland cells”. Las “garland cells”, se denominan así porque son un conjunto de 25 células binucleadas dispuestas en guirnalda alrededor del esófago que se encuentran ligadas al proventrículo a lo largo de todos los estadios del desarrollo (Figura 11). En los invertebrados, los nefrocitos regulan la composición de la hemolinfa, retirando los productos tóxicos mediante su gran capacidad endocítica. Los nefrocitos en guirnalda fueron observadas por primera vez en el año 1964 en la larva de *Musca vomitoria* por Weissman. Son muy parecidos en estructura y función a las células pericárdicas y son clasificadas juntas como nefrocitos.

En trabajos recientes se ha demostrado que los nefrocitos en guirnalda derivan del mesodermo de la zona más anterior del embrión. El mesodermo cefálico se divide en dos: el mesodermo cefálico primario (“*Primary head mesoderm*”; PHM) que se forma a partir de la zona más anterior del pliegue ventral y el mesodermo cefálico secundario (“*secondary head mesoderm*”; SHM) derivado de la región procefálica que rodea al pliegue ventral. Los nefrocitos en guirnalda derivan concretamente de una región denominada ISHM (de Velasco y cols., 2006) (Figura 12).

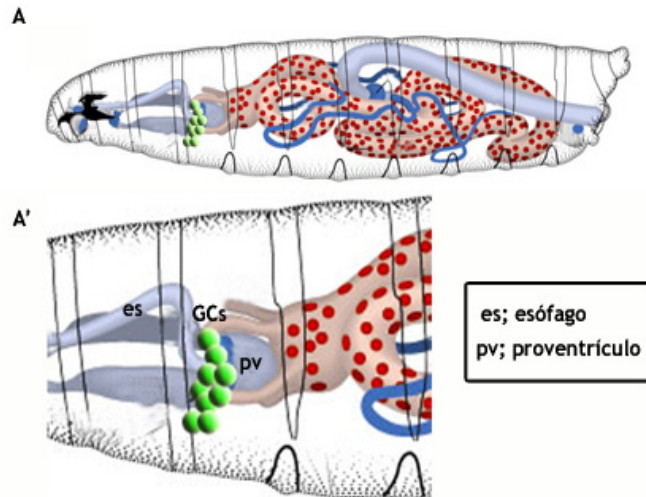


Figura 11.- Localización de las GCs en la larva de *Drosophila*. Esquema modificado del “Atlas of *Drosophila* Development” (Hartenstein, 1993). (A) Larva de *Drosophila* en la que están esquematizados el sistema digestivo y en verde los nefrocitos en guirnalda (GCs). (A') Ampliación de la imagen anterior en la que se puede ver como las GCs están asociadas al proventriculo y rodeando el esófago.

La ultraestructura de los nefrocitos ha sido descrita en diferentes especies de insectos, entre ellos *Manduca sexta* (Abbey C. Brockhouse, 1999), *Ceratitis capitata* (Romano Dallai, 1993), *Locusta migratoria* (Abboud Harrat, 1999) y *Drosophila melanogaster* (Aggarwal y King, 1967). La morfología en todas ellas es similar. Los nefrocitos están rodeados por una membrana basal de 25-30nm y la membrana plasmática subyacente se invagina formando pliegues superficiales que penetran hacia el interior de la célula formando cavidades llamadas canales de laberintina. El citoplasma que rodea a las aberturas de la membrana plasmática es denso a los electrones y un fino puente de material extracelular se expande de un lado de la abertura a otro (Kosaka y Ikeda, 1983). Se pensó que estas uniones superficiales podrían tener un papel en la discriminación de las partículas que eran internalizadas para ser después endocitadas (Aggarwal y King, 1967). La morfología de los nefrocitos corresponde a la de

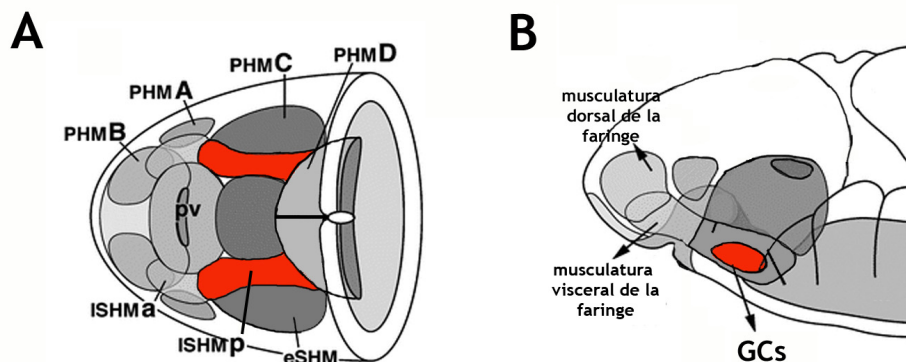


Figura 12.- Representación esquemática de los derivados del mesodermo cefálico embrionario. Esquema modificado de “Subdivision and developmental fate of the head mesoderm in *Drosophila melanogaster*” (de Velasco y cols., 2006). (A, B) Visión ventral (A) y lateral (B) de la región cefálica en embriones de estadio 10. Las GCs derivan de dos agrupaciones celulares a ambos lados de la cabeza llamadas mesodermo cefálico secundario tardío posterior (ISHMp, rojo). En tonalidades grises se indican el mesodermo cefálico primario A, B, C y D (PHM A, B, C y D), el mesodermo cefálico secundario temprano (eSHM) y el mesodérmico cefálico secundario tardío anterior (ISHMa). También se indican la musculatura dorsal y visceral de la faringe (B).

células altamente especializadas en endocitosis. La mayoría de las vesículas endocíticas se generan dentro de los canales, por lo que la actividad endocítica de los nefrocitos estaría en su mayoría localizada dentro de estas cavidades. La endocitosis en estas células está relacionada con la función que se ha comprobado que poseen de retirada de productos de desecho de la hemolinfa (Aggarwal y King, 1967; Kosaka y Ikeda, 1983; Abbey C. Brockhouse, 1999). Desde estos primeros trabajos descriptivos hasta ahora, no se ha avanzado mucho en su caracterización, aunque se han utilizado para el estudio de componentes necesarios de la vía endocítica (Chang y cols., 2002).

Nosotros en este trabajo hacemos un análisis ultraestructural y funcional de estos nefrocitos en el contexto de su capacidad filtradora, relacionándolos con los podocitos de vertebrados.

4

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es analizar el papel funcional que tienen las proteínas Dumbfounded (Duf) y Sticks and stones (Sns) en el desarrollo de los nefrocitos en guirnalda de *Drosophila*. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1- Analizar los patrones de expresión de Duf y Sns en los nefrocitos en guirnalda a lo largo del desarrollo. Para lo cual se necesitó generar anticuerpos policlonales contra los dominios intracelular (anti-Duf_{int}) y extracelular (anti-Duf_{ext}) de la proteína Duf.
- 2- Estudiar el papel funcional de *duf* y *sns* en los nefrocitos en guirnalda, para lo cual generamos condiciones mutantes para ambos genes. Deficiencias que eliminaran sólo el gen *duf*, sin afectar a su parálogo *rst*, y líneas *UAS-ARN-interferente-sns* que atenúan la función de *sns*.
- 3- Identificar los componentes del complejo mutiprotéico en el que participan Duf y Sns en los nefrocitos.
- 4- Analizar la falta de función de Polychaetoid, un componente de la vía de señalización del complejo Duf/Sns en nefrocitos.

Además, otro objetivo de esta tesis consiste en evaluar la falta de función de Duf en el sistema muscular.

5

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de moscas

La cepa silvestre empleada fue *Oregón-R* (OR) .

Alelos mutantes

Las deficiencias de *duf* usadas en este estudio son *Df(1)w^{67k30}*, *Df(1)duf^{sps1}*, *Df(1)duf^{sps2}* y *Df(1)duf^{pmf}* (las tres últimas generadas como se indica más adelante). Para el análisis de *sns*, se empleó el alelo nulo *sns^{XB3}* (Bour y cols., 2000). Además, se han empleado alelos mutantes para otros genes como son: *rols^{A1096}*, *mbc^{A680}*, *cycA^{A551}* (M. Ruiz-Gómez), *rst⁶* (Ramos y cols., 1993), *pyd^{tam}* (Takahashi y cols., 1998) y las deficiencias de *pyd*: *Df(3R)BSC478* y *Df(3R)BSC506* (Bloomington Stock Center).

Líneas GAL4

Dmef2-GAL4 (Ranganayakulu y cols., 1995), *duf-GAL4* (M. Ruiz-Gómez), *G447-GAL4* (Weavers y cols., 2009) y *prospero-Gal4* (cedida por C.Doe).

Líneas UAS

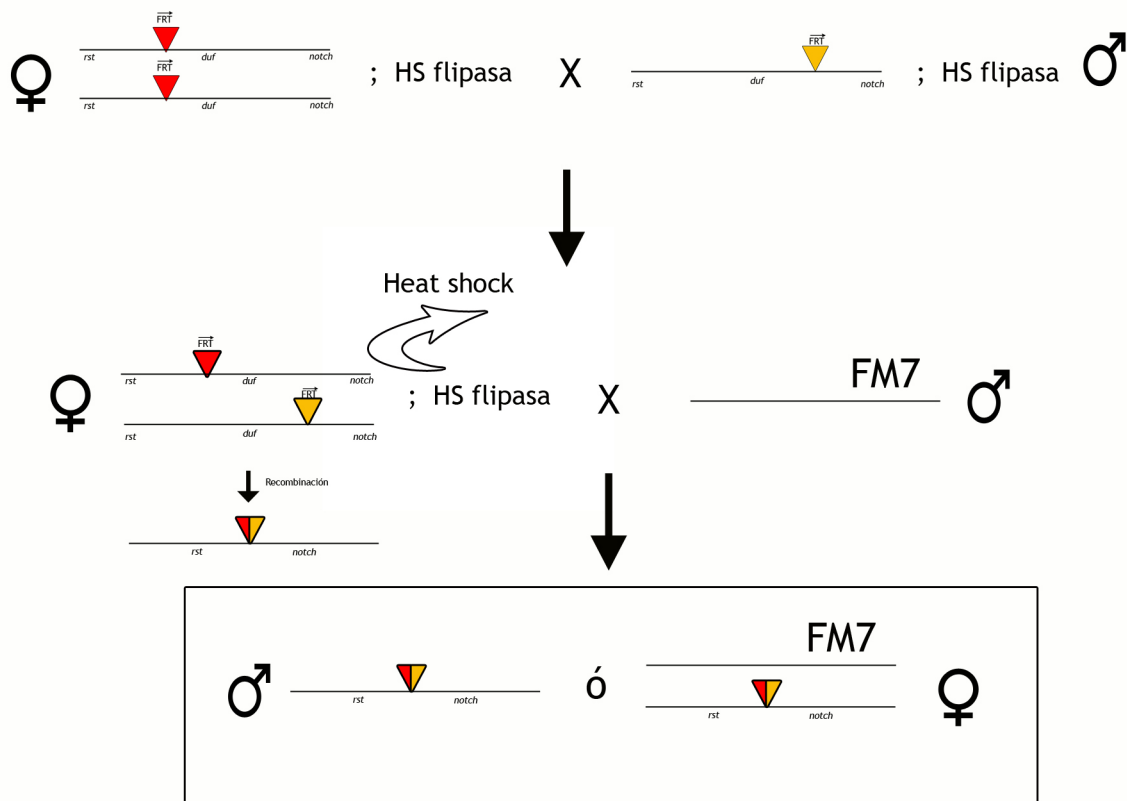
UAS-ARNi-sns, *UAS-ARNi-rst*, *UAS-ARNi-hbs* (obtenidas en este trabajo) *UAS-rols* (Menon y cols., 2005), *UAS-pyd-GFP* (cedida por M. Affolter).

Otras

Una inserción enhancer trap que sitúa el gen de la β -galactosidasa bajo el control de la región promotora de *duf*, *rP298* (Nose y cols., 1998) y tres elementos transponibles para la generación de deficiencias de *duf*: *PBac(RB)^{e03354}*, *PBac(RB)^{e04391}* y *P(XP)^{d08289}* (colección Exelixis de Harvard).

Obtención de nuevas deficiencias de *duf*

Se utilizó el método de Exelixis/DrosDel para generar deleciones genómicas que eliminaran sólo el gen *duf* (Parks y cols., 2004; Thibault y cols., 2004). Esta técnica está basada en la disponibilidad de numerosas inserciones de elementos transponibles con sitios de recombinación FRT a lo largo de todo el ADN genómico de *Drosophila*. Cuando dos de



Esquema de cruces para la generación de las deficiencias *Df(1)duf^{sps1}* y *Df(1)duf^{sps2}*. Las líneas que contienen el elemento transponible de interés (triángulos invertidos rojos y amarillos, ver figura 17) se combinan con la línea HS-Flipasa (Heat shock Flipasa) y se induce la recombinación de las secuencias FRT por golpes de calor de 1 hora de duración a 37°C cada 24h, hasta la emergencia de los adultos. De este cruce se seleccionan las hembras heterocigóticas que contengan ambos transposones y se cruzan individualmente con machos que portan el balanceador FM7. Se seleccionaron para su posterior análisis un total de 25 hembras sobre FM7 y 25 machos (por si la deficiencia fuera viable) de entre los cuales obtuvimos líneas con las deficiencias descritas.

estos transposones con secuencias FRT en la misma orientación están insertos en puntos relativamente próximos de dos cromosomas homólogos, la Flipasa (recombinasa) puede mediar la recombinación entre ellos. De este modo, la región genómica comprendida entre ambas inserciones es deletionada, quedando una inserción que corresponde a un transposón híbrido. Dependiendo de la combinación de inserciones usadas la deficiencia puede detectarse por pérdida del gen *white* en el transposón híbrido, y por lo tanto ser reconocida fácilmente. En nuestro caso ninguna de las deficiencias producía esta pérdida por lo que su identificación se hizo mediante análisis de productos de PCRs. En el esquema se muestra el procedimiento seguido para la generación de las deficiencias *Df(1)duf^{sps1}* y *Df(1)duf^{sps2}*.

Inmunohistoquímica

Fijación de embriones

(Basado en el protocolo descrito en Goriely y cols., 1991).

Se recogen los embriones obtenidos en puestas de una duración y temperatura adecuadas en función del estadio embrionario requerido para el experimento. Posteriormente se decorionan en lejía 1-2min., se lavan con agua, se retira el exceso de líquido y se recogen en heptano. Se fijan 20min. agitando en una mezcla heptano/ fijador (1:1) recién preparado, siendo el fijador una solución de formaldehído al 8% en PBS. Se retira entonces el fijador (fase inferior) y se desvitelinizan los embriones añadiendo MeOH (con la excepción de embriones en los que se quiera observar la proteína GFP, caso en el cual ha de utilizarse EtOH 80% recién preparado en vez del MeOH). Se conservan en el mismo alcohol a -20°C.

Fijación de nefrocitos en guirnalda de tercer estadio larvario

Los nefrocitos en guirnalda se diseccionan de larvas de tercer estadio mantenidas en PBS frío, se acumulan en paraformaldehído al 4% en hielo y se fijan en esta solución durante 30min. a temperatura ambiente con agitación. Tras lavar con PBT (Tritón X100 al 0,3% en PBS) tres veces durante 10min. se continúa con el protocolo de tinción inmunohistoquímica.

Fijación por calor

Se trata de un protocolo de fijación alternativo para preservar aquellos antígenos que se deterioran con la fijación con aldehídos. En nuestro caso lo usamos para la fijación previa a inmunohistoquímica con anticuerpos contra proteínas SF-Ig. Se fijan por calor tanto embriones como nefrocitos en guirnalda de tercer estadio. Para ello, se recogen los embriones y se decorionan ó se diseccionan los nefrocitos como se indicó previamente. El material a fijar se deposita en cestillos que se sumergen en una solución NaCl 0,7%; Tritón X100 0,05% a 90°C durante 5s. e inmediatamente se depositan en la misma solución a 4°C. En el caso de los nefrocitos de tercer estadio ya se puede proceder a la tinción y en el caso de los embriones se desvitelinizarán siguiendo el mismo protocolo que la fijación con paraformaldehído.

Tinciones inmunohistoquímicas de embriones

(Basado en el protocolo descrito Ruiz-Gómez y Ghysen, 1993)

Los embriones previamente fijados se hidratan en PBT (Tritón X100 al 0,3% en PBS) y posteriormente se bloquean 30min. en PBT-BSA (BSA 10mg/ml en PBT). Se incuban con el anticuerpo primario a la concentración adecuada en PBT-BSA toda la noche a 4°C. Se lavan y se bloquean de nuevo para ser tratados seguidamente con el anticuerpo secundario 1-2h. a t.a. A partir de aquí el protocolo difiere en función del anticuerpo secundario empleado. Si se utiliza un anticuerpo fluorescente, hay que volver a lavar con PBT, aclarar con PBS y guardar en medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories). En caso de tinciones dobles se trata con los dos secundarios fluorescentes de manera simultánea. Si se trata de un anticuerpo biotilado, hay que lavar con PBT, tratar 30min. con ABC Elite kit (Vectorlabs) y volver a lavar y revelar con Diaminobencidina 0.5mg/ml y H₂O₂ al 1%. En el caso de tinciones dobles, se debe añadir a este primer revelado una solución de NiSO₄ y CoCl₂ al 1% y tras lavar con PBT repetir todo el tratamiento con el segundo anticuerpo secundario, revelando sin la adición de sales. Finalmente los embriones se deshidratan en diluciones progresivas de EtOH en PBS, se lavan dos veces en EtOH absoluto, se embeben en una mezcla epón/acetona (1:1) al menos 12h. a 4°C y se montan en epón.

Inmunohistoquímica de nefrocitos en guirnalda de tercer estadio

Para realización de inmunohistoquímica en los nefrocitos en guirnalda de tercer estadio se siguió el método descrito en Cubas y cols., 1991, para los discos imaginales de larvas de *Drosophila*.

Fijación e inmunohistoquímica celular

(Basado en el protocolo descrito en Roll-Mecak y Vale, 2005)

Las células S2 se recogen de las placas y se fijan directamente 30min. con PFA al 4%, se permeabilizan tratándolas 15min. con PBT (tween al 0,1% en PBS) y posteriormente se bloquean durante 15min. con PBT-BSA (BSA al 1% en PBT). A continuación se tratan con el anticuerpo primario 1h. a temperatura ambiente, se lavan 3 veces con PBT y se mantienen otra hora con el anticuerpo secundario. Tras este proceso las células se lavan con PBS y se montan en Mowiol.

Lista de anticuerpos

ANTICUERPO	OBTENIDO EN	VISIBLE	FLUORESCENCIA	REFERENCIA
anti-Eve	conejo		1/1000	Frasch y cols, 1987
anti-GFP	conejo		1/300	Molecular Probes
anti-GFP	ratón	1/5000 (Blot)		Roche
anti-Osa	ratón		1/50	Banco de hibridomas
anti-Rols	ratón		1/2000	Menon y Chia, 2001
anti-Tropomiosina	rata	1/400	1/200	Babraham technix
anti-Sns	conejo	1/100	1/200	Bour y cols, 2000
anti-beta galactosidasa	mouse	1/5000	1/500	Promega
anti-Dufint	conejo	1/200	1/100	Este trabajo
anti-Dufext	cobaya	1/100	1/50	Este trabajo
anti-V5	ratón	1/1000 (en Western)	1/500	Invitrogene
anti-Kz (titina)	rata		1/1000	Machado y cols, 1993
anti-Dap160	conejo		1/200	Bruno Marie, 2004
anti-HRP-Cy3			1/100	Jackson ImmunoResearch

MARCADORES FLUORESCENTES: To-pro-3 (Invitrogene 1mM) usado 1:500 y Faloidina (Sigma) usada a una dilución final de 0,25µM.

Las imágenes obtenidas de tinciones fluorescentes se tomaron con el microscopio confocal Microradiance (BioRad) acoplado a un microscopio vertical Axioskop2 (Zeiss) o bien con un microscopio de barrido láser confocal LSM510META (Zeiss) acoplado a un microscopio invertido ó vertical Axiovert (Zeiss).

Hibridaciones “in situ” con sondas de ARN-DIG

(Basado en el protocolo descrito en Tautz y Pfeifle, 1989)

Síntesis de sondas de ARN-DIG

Se sintetizaron diversas sondas. Una para *mbc*, partiendo del EST RE54856. Otra para *pyd*, partiendo del EST LD43161 y la última para el gen *CG32094* (RH58005). En todos los casos se abrió el plásmido en el extremo 5' de la secuencia del gen con NotI, EcoRI ó SmaI (para *mbc*, *pyd* y *CG32094*, respectivamente). Los fragmentos obtenidos tras la digestión fueron purificados por extracción de un gel de agarosa al 1% con el kit QIAquick gel extraction kit (QIAGEN). Fueron posteriormente precipitados con NaAc (0,3M) y EtOH (2,5vol.), y resuspendidos en agua (depc). La reacción de síntesis fue llevada a cabo empleando el DIG RNA Labeling kit (Roche) siguiendo el protocolo en él recomendado, utilizando la T3 polimerasa para el caso del RE54856 y el RH58005 y la polimerasa SP6 para LD43161. Las sondas para *duf*, *hbs*, *rst* y *tieg* (*cabut*) fueron elaboradas en el laboratorio con el mismo método.

Hibridación in situ con sondas de ARN

Para trabajar se utiliza material libre de RNAasa.

Los embriones fijados como se ha indicado previamente y conservados en metanol se aclaran sucesivamente con metanol, metanol/4%PFA (1:1) y 4%PFA. A continuación se realiza una postfijación de 20min. con 1ml de 4%PFA tras la cual, los embriones se aclaran y lavan 5min. con PBT (tween al 0,1% en PBS). Se aclaran entonces sucesivamente con PBT, una mezcla (1:1) de PBT/ SH, con SH y se mantienen prehibridando 1h. como mínimo a 55°C en 500µl de SH (siendo SH la solución de hibridación compuesta por: formamida 50%, SSC 4x, Denhardt's 1x, tARN 250µg/ml, ADN de salmón 250µg/ml, heparina 50µg/ml, y Tween-20 0,1%). A continuación se mantienen toda la noche hibridando a 55°C con la sonda en 100µl de SH y desnaturalizada por calor a 80°C, 5min. Al día siguiente se realizan dos lavados de 5 y 15min. a 55°C con SH y seguidamente se aclaran los embriones con SH-sin en PBT al 70%, 50% y 30% de manera sucesiva (SH-sin contiene formamida 50%, SSC 2x y Tween-20 0,1%). Se lavan los embriones 3 veces durante 30min. y se incuban durante 2h. a t.a. con el anticuerpo anti-Digoxigenina 1:2000 en PBT. Se lavan de nuevo 3 veces durante 30min.

con PBT y se aclaran dos veces en SS (siendo SS una disolución que contiene NaCl 100mM, MgCl₂ 150mM, Tris pH 9.5 100mM y tween-20 al 0,1%). Finalmente para revelar se añaden 500µl de SS con 9µl de NBT y 7µl de X-fosfato y se mantiene revelando a 37°C protegido de la luz. Cuando la señal sea la adecuada se lavan los embriones con PBT, se deshidratan con EtOH y se montan en epón.

Hibridación *in situ* con sonda de ARN/tinción con anticuerpo

El protocolo empleado para tinciones dobles “*in situ*/anticuerpo” es exactamente igual al anteriormente descrito para la hibridación “*in situ*” hasta el proceso de hibridación. Una vez finalizado éste, se realizan a lo largo del día 4 lavados a 55°C con SH-sin manteniendo el último durante toda la noche. El tercer día de protocolo, se aclaran y lavan los embriones con PBT durante 30min. y se incuban 2h. a temperatura ambiente con el anticuerpo primario más anti-Digoxigenina. Se vuelven a lavar 4 veces durante 15min. con PBT y se incuban 1h. con el anticuerpo secundario más anti-Digoxigenina. Los embriones se lavan de nuevo 4 veces durante 15min. con PBT y se procede al revelado como en el caso de tinciones inmunohistoquímicas. Posteriormente, se vuelven a lavar los embriones y se revela la sonda como en el caso de la hibridación “*in situ*”.

Cultivos celulares y transfección

Las células S2 se cultivan en el medio X-Press (Gibco) enriquecido con 9%FCS a 25°C. Para transfectar se ponen el día anterior 7x10⁶ células por placa p100 para que al día siguiente se encuentren al 80% de confluencia. Se emplea el kit Fugene6 (Roche) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. En nuestro caso concreto se pusieron 37,5µg de ADN (en 900µl de medio X-Press libre de suero y antibióticos) y 105µl de Fugene6 (en 1875µl de medio X-Press). Tras 4h de incubación se retiró la mezcla de transfección y se añadió medio completo a las células. En los casos en que se usa el plásmido pMK33/pMtHy, la inducción se realiza al día siguiente con 700µM de CuSO₄ durante 24h. tras lo cual las células están listas para ser fijadas y teñidas ó para obtener extractos de proteínas celulares.

Obtención de extractos de proteínas

Las células S2 se centrifugan a 1000 rpm durante 5min. tras lo cual se lavan con 10ml de PBS y se centrifugan a 1000rpm durante 5min. El pellet se resuspende en 300µl de tampón RIPA (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7,5, 1% NP40, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS, inhibidores de preteasas, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 100µM NaF y 300µM ortovanadato sódico) en un tubo eppendorf, se homogeniza y se incuba con agitación a 4°C durante 90min. Posteriormente la muestra se centrifuga a 12000 rpm a 4°C durante 15min. y el sobrenadante se usa inmediatamente o se congela a -70°C. La concentración de proteína del extracto se determina por el método Bradford.

La mezcla de inhibidores de proteasas usada fue: 100µM PMFS en EtOH, 10µg/ml inhibidor de tripsina de germen de trigo, 1mM benzamidina y una dilución 1:1000 de aprotinina.

Inmunoprecipitación

Se obtiene el extracto de proteínas tal como se ha indicado previamente. A continuación, a 150µl de sobrenadante (la mitad de una placa p100 de células S2 transfectadas para inmunoprecipitar) se le añade 40µl de BSA, 5µl de anticuerpo (anti-V5, anti-GFP ó anti-Duf_{int}) y se completa hasta 600µl con tampón RIPA. Se mantiene toda la noche agitando a 4°C y al día siguiente se añaden 30µl de bolitas de proteína A sefarosa resuspendidas en PBS (1:1) (en el caso de usar un anticuerpo policlonal) y 30µl de proteína G-sefarosa (en el caso de ser monoclonal). Se mantiene otras 2h. agitando en frío, se centrifuga 5min. a 1000 rpm, se retira el sobrenadante y se lavan las bolitas 4 veces con 10ml de tampón RIPA más inhibidores. Finalmente, las bolitas se resuspenden en tampón de carga y se cargan en geles de poliacrilamida para el posterior análisis de los productos inmunoprecipitados por “Western blot”.

Análisis de proteínas transferidas a membrana (“Western blot”)

Todas las disoluciones necesarias para el protocolo se preparan según se describe en (Sambrook y cols., 1989). Las muestras se disuelven en tampón de carga, se hierven 5min. para desnaturalizar las proteínas y se corren en un gel de acrilamida al 8% a 100 voltios (incluyendo entre las muestras el marcador de tamaño de proteínas Rainbow (Amersham). A continuación se transfieren las proteínas a una membrana de nitrocelulosa con ayuda de una cubeta de transferencia y manteniendo el sistema 1,5-2h. a 100mA en tampón de transferencia a 4°C. Una vez finalizado el proceso se bloquea la membrana 1h. a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (tween-20 al 0,1% en PBS con un 5% de leche desnatada en polvo) y luego se mantiene toda la noche a 4°C incubando con el anticuerpo primario en tampón de bloqueo. Al día siguiente se lava 3 veces 10min. con PBT (tween-20 al 0,1% en PBS), se repite el bloqueo y se incuba con el anticuerpo secundario 1h. a temperatura ambiente. Se lava de nuevo la membrana con PBT y si se ha utilizado un secundario HRP que se revela directamente con ECL. Si por el contrario se ha usado un secundario biotilado hay que realizar un tratamiento intermedio de 30min. con Peroxidase Standard ABC kit (Vector lab.)

Clonajes

pUAST-ARNi-sns

Se eligió una zona de *sns* que no presentara homología con ningún otro gen y se

amplificó mediante PCR con los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido 5': 5'CCAGTTCGTATAATGACACCG-3'

Oligonucleótido 3': 5'CCTACAGCTATACGAGGTGTC-3'

El fragmento de 1047pb fue clonado en el vector pstBlue-1 (Novagen). A continuación se clonó el fragmento BamHI/SacI obtenido del plásmido anterior en el vector pHIBS (Nagel y cols, 2002) digerido con las mismas enzimas. Después se realizó una triple ligación con los siguientes fragmentos: NotI/SphI sacado del vector pstBlue-1, SphI/XhoI del pHIBS, y el vector PBS-KS con NotI/XhoI. El fragmento NotI/kpn fue obtenido del PBS-KS para ser clonado definitivamente en el pUAST, seleccionando el clon con la orientación del inserto adecuada.

pUAST-ARNi-rst

El método a seguir fue el mismo que en el caso anterior pero la PCR del fragmento ampliado de *rst* se llevó a cabo con los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido 5' 5'-CACGTCTCGTGGACGTTCAAC-3'

Oligonucleótido 3' 5'-CTGTTGGTCAGGAAGGTCATC-3'

pUAST-ARNi-hbs

La PCR del fragmento ampliado de *hbs* se realizó con los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido 5' 5'-CGAAATGGCGTGGCCATCAG-3'

Oligonucleótido 3' 5'-CTGTCCACCAGTTTGGAGGG-3'

pMK33/pMtHy-duf

Se partió de un clon del *ADNc-duf* (3520pb) en PBS-KS que se digirió con EcoRV/BglII clonándose el fragmento obtenido en el plásmido pMK33/pMtHy digerido con EcoRV/BamHI.

pMK33/pMtHy-dufGFP

Se partió de un clon del *ADNc-dufGFP* (3943pb) en PBS-KS, tras digestión con EcoRV/BglII el fragmento obtenido se clonó en el plásmido pMK33/pMtHy digerido con EcoRV/BamHI.

pAc 5.1-V5-His-pyd

Se realizaron dos PCRs para ampliar fragmentos del *ADNc-pyd* flanqueados por sitios de cortes para las enzimas de restricción NdeI en el extremo 5' (PCR-1) y XhoI en el extremo 3' (PCR-2) quitando el STOP codon del ADNc para que el epítipo V5 del plásmido pAc 5.1-V5-His (versión A) sea leído en fase a continuación del *ADNc-pyd*.

Para la primera PCR se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido 5' 5'-CTATGGAGGACAGTCGCGATGG-3'

Oligonucleótido 3' 5'-GATGATGTCACCCTCTTGCAAGC-3'

La PCR-2 se realizó con los oligonucleótidos:

Oligonucleótido 5' 5'-CAGAAATGCCAGCAGTGGTCAG-3'

Oligonucleótido 3' 5'-CTGGAGAGCGGGGAATGACCA-3'

Los productos de PCR se clonaron en el vector PGEMt-easy seleccionando la orientación adecuada de tal manera que se pueda abrir el clon de la PCR2 con NdeI/BglII e introducir el fragmento sacado de la PCR-1 con las mismas enzimas. Obteniendo así el ADNc-pyd con NdeI en su extremo 5' y XhoI en el extremo 3' en el vector pGEMt-easy. Finalmente, se obtiene el fragmento a clonar por digestión con NdeI, seguida de tratamiento con Klenow para hacer romo el extremo de ADN obtenido y digestión posterior con XhoI, y se clona en el vector pAc 5.1-V5-His (versión A) digerido con EcoRV/XhoI.

pGEX2T-Duf_{int}

Esta construcción se hizo para la posterior obtención de un anticuerpo específico contra la zona intracelular de Duf (del aa 599 al 801). Por PCR sobre el ADNc de *duf* se introdujeron los sitios de corte BamHI/EcoRI en los extremos 5'/3' respectivamente del fragmento a clonar en el vector de expresión PGEX2T. Se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido 5' 5'-GGATCCCGCAAGCGACGCAGTC-3'

Oligonucleótido 3' 5'-GAATTCCATTCTGCAGCAGCG-5'

pET-Duf_{ext}

Esta construcción se utilizó para la posterior obtención del anticuerpo específico contra la región extracelular de Duf (aa 68-567). Se amplió un fragmento de ADN de la región extracelular de Duf mediante PCR con los siguientes oligonucleótidos, con los cuales introdujimos los sitios de corte para las enzimas NdeI/BamHI en los extremos 5'/3', respectivamente:

Oligonucleótido 5' 5'-CATATGGCATCGTCAGCGAATG-3'

Oligonucleótido 3' 5'-GGATCCGTTCGCGTAGCAATG-3'

Finalmente, mediante digestión con NdeI/BamHI se obtuvo el fragmento duf_{ext} que se clonó en el vector PET-14b (Novagen) con las mismas enzimas de digestión.

Generación de anticuerpos

Anticuerpo anti-Duf_{ext}

Partiendo de la construcción pET-Duf_{ext}, se indujo la expresión de la proteína de fusión Duf_{ext}-His que contiene los aminoácidos 68-567 de Duf fusionados a una cola de Histidinas.

La proteína fue obtenida del gel de acrilamida y utilizada directamente para inocular ratas y cobayas siguiendo el esquema de trabajo siguiente:

La cantidad de antígeno usada en cada inoculación fue de 150µg para las ratas y 300µg para las cobayas y el volumen inyectado de 400µl y 600µl respectivamente. La mezcla de inyección se preparó diluyendo el fragmento del gel de acrilamida con adyuvante Freund's de Sigma (completo para la primera inoculación e incompleto para las siguientes) mezclados en proporción 1:1 y posteriormente sonicados. Las inoculaciones se realizaron cada 15 días y las extracciones de sangre se hicieron a partir de la tercera inyección y transcurridos 10 días desde la última inoculación. El procesamiento del suero se realizó manteniendo la sangre a 37°C durante 2h. y posteriormente toda la noche a 4°C. Se centrifuga entonces 15min. a 13000 rpm y se separa el suero, el cual se conserva a -70°C. Finalmente el anticuerpo que se usa en este trabajo pertenece al obtenido de una de las cobayas.

Anticuerpo anti-Duf_{int}

Partiendo de la construcción pGEX2T-Duf_{int} que contiene desde el aa 599 al 801 de la proteína (correspondiente a la zona intracelular), la proteína de fusión con GST fue purificada a partir del lisado de las bacterias BL21, utilizando una columna de glutation-sepharosa 4B (Zyomed) y según el protocolo de la casa comercial para purificación de proteínas en condiciones desnaturalizantes. La proteína obtenida se usó para inocular ratas y conejos según el esquema de trabajo anterior variando las cantidades inoculadas a los conejos que es de 500µg de antígeno en un volumen total de 1000µl. El anticuerpo que se usa a lo largo de esta tesis es el obtenido en conejo.

Amplificación por PCR

Todas las reacciones de amplificación han sido realizadas empleando la polimerasa Bio-taq (Bioline) ó la High Fidelity (Roche), siguiendo las recomendaciones proporcionadas por la casa comercial y utilizando el equipo de PCR 9700 (Applied Biosystems).

Transformación de embriones de *Drosophila*

La obtención de moscas transgénicas se realiza mediante la inyección de embriones de la cepa huésped *yw* empleando el protocolo establecido en Spradling y Rubin, 1982. La mezcla inyectada contiene el ADN a integrar, el cual incluye las secuencias de interés y el marcador *w⁺* para reconocer las moscas transformadas, a una concentración de 1µg/µl y una fuente de transposasa ($\Delta 2,3$), para que pueda insertarse en el genoma, a una concentración de 0,3µg/µl. Los individuos transformantes obtenidos se identifican por la expresión del gen *w⁺* y se cruzaron con las líneas adecuadas para su localización cromosómica y balanceo.

Tratamiento de cubreobjetos con polilisina

Para obtener cubreobjetos adherentes estos se tratan con polilisina. Para ello, se lavan con agua y EtOH y se sumergen en la solución de polilisina (90% de polilisina 0'1% de Sigma-Aldrich, 0,25% de Photo-Flo y 9,75% de agua mQ) durante 10min., secándose a 60°C. El proceso se repite 4 veces y los cubreobjetos se almacenan a 4°C. Estos cubreobjetos fueron usados para la microscopía electrónica de barrido y para hacer tinciones de las células S2.

Degradación de la membrana basal de los nefrocitos en guirnalda larvarios

Se prepara una solución de colagenasa 0,2% en PBS mediante incubación a 37°C durante 1h., manteniéndose a 4°C durante semanas sin que se pierda actividad. Los nefrocitos en guirnalda se diseccionan e incuban a 37°C durante 1min. con una dilución 0,1% en PBS de la solución preparada anteriormente. Transcurrido este tiempo los nefrocitos se separan del cable de actina y quedan como células individuales.

Microscopía electrónica

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

(A) Microscopía electrónica de transmisión de embriones

Se decorionan los embriones en lejía durante 2min. y se fijan con 12,5% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1M pH 7,4 (1:1) con heptano durante 10min. en agitación a temperatura ambiente. Se desvitelinizan a mano con ayuda de un celo de doble cara y se fijan 1h. en 4%PFA, 2% glutaraldehído y 2% ácido tánico en cacodilato 0,1M pH 7,4. Se lavan 3 veces en tampón cacodilato durante 5min. y se postfijan 1h. en 1%OsO₄, 1%FeCk en agua a 4°C. Se incuban en acetato de uranilo al 2% 1h. en oscuridad y posteriormente se lavan con agua 3 veces durante 5min. y se deshidratan con acetona a concentraciones crecientes en agua, 50%, 70%, 90% y 100% durante 10min. a temperatura ambiente. La infiltración en epón se hace en varios pasos: 30min. en acetona:epón (3:1), 1h. en acetona:epón (1:1), 3h. acetona:epón (1:3) a vacío, epón 100% durante 1h. y se dejan polimerizando en una estufa a 65°C durante 48h.

(B) Microscopía electrónica de nefrocitos en guirnalda larvarios

(basado en el protocolo establecido en Kosaka y Ikeda, 1983)

Los nefrocitos en guirnalda se diseccionan y se fijan en 2% PFA, 2% glutaraldehído durante 2h. a 4°C. A continuación, se lavan con agua se tratan con 2% OsO₄ en tampón cacodilato pH 6,8 (0,1M) durante 1h. y se lavan de nuevo con agua para después añadir ácido tánico al 2% durante 1min. Se deshidratan con concentraciones crecientes de etanol y posteriormente con óxido de Propileno. Se dejan toda la noche con epón:óxido de Propileno 1:1. Al día siguiente se dejan 4h. con epón y se orientan de forma adecuada en los moldes para

que polimerice la resina incubando al menos 48h. a 65°C.

Los cortes fueron realizados por el servicio de microscopía electrónica del CBMSO y las imágenes fueron tomadas con un microscopio Jem1010 (JEOL), operando a 80kV.

Microscopía electrónica de Barrido de nefrocitos en guirnalda larvarios

El protocolo es igual al seguido para la preparación de muestras de microscopía de transmisión hasta los pasos de deshidratación anteriores a la inclusión en epón, pero realizando todo el tratamiento con los nefrocitos en guirnalda fijados a los cubres de polilisina.

Alimentación de larvas con metales

Se ponen puestas de embriones del genotipo que nos interese y se dejan envejecer hasta que eclosionan las larvas. Son pasadas a una papilla enriquecida en cobre (CuSO_4 , 0,8mM) ó en plata (AgNO_3 , 0,3mg/ml). Posteriormente se incuban a 25°C hasta que llegan a tercer estadio larvario y se cuentan las que han sobrevivido.

Otros

Todos los métodos generales de biología molecular que no se mencionan fueron llevados a cabo según los protocolos habituales descritos en (Sambrook y cols., 1989).

6

RESULTADOS

1. ESTUDIO FUNCIONAL DE DUMBFOUNDED Y STICKS AND STONES EN NEFROCITOS DE DROSOPHILA.

1.1. Patrón de expresión de *dumbfounded* y *sticks and stones* en los nefrocitos en guirnalda

La expresión diferencial de las proteínas de la SF-Ig: Duf en mioblastos fundadores (MF) y Sns y Hbs en mioblastos competentes en fusión (MCF), es la que media el reconocimiento entre ambos tipos de mioblastos que desencadena el proceso de fusión y depende de la interacción en trans entre las regiones extracelulares de Duf y Sns (Menon and Chia, 2001; Galletta et al., 2004). Aunque se ha descrito en detalle esta expresión y su requerimiento en miogénesis, Duf y Sns no son proteínas exclusivas de mioblastos, sino que ambas se expresan en otro derivado mesodérmico, los nefrocitos (Ruiz-Gómez et al., 2000; Weavers et al., 2009; este trabajo) y en algunas neuronas del sistema nervioso central (Ruiz-Gómez et al., 2000). En el sistema nervioso las proteínas SF-Ig podrían funcionar de forma análoga al sistema muscular, mediando reconocimiento entre neuronas ó entre neuronas y sus células diana, como en el caso de los ortólogos de Duf (SYG-1) y Sns (SYG-2) en el nematodo *C. elegans* (Shen and Bargmann, 2003; Shen et al., 2004). No obstante, la expresión

de Duf y Sns en nefrocitos sugería que estas proteínas podrían funcionar de forma distinta en estas células donde parecen coexpresarse. Este resultado nos pareció muy interesante ya que en el único sistema en el que se ha descrito la coexpresión de ambas proteínas es en los podocitos renales, donde los ortólogos humanos de Duf (NEPH 1) y Sns (nephrin) (Kestila et al., 1998; Sellin et al., 2003) forman parte de un complejo multiprotéico distinto al que opera en el proceso de fusión y que es necesario para la formación del diafragma de filtración renal. Para confirmar la posible coexpresión de Duf y Sns en los nefrocitos, lo primero que decidimos hacer fue una búsqueda de marcadores de este tipo celular para establecer el patrón de expresión temporal de *duf* y mediante estudios de colocalización determinar si la expresión de Sns coincidía con la de Duf a lo largo del desarrollo de los nefrocitos. Decidimos utilizar el anticuerpo HRP (Horseradish peroxidase) que reconoce carbohidratos de glicoproteínas específicas de tejido nervioso y nefrocitos en guirnalda (Snow et al., 1987) y el gen *CG32094*, cuya expresión según la base de datos de Bekerley *Drosophila* Genome Project (BDGP; <http://fruitfly.bekerley.edu>), está restringida a este subtipo celular. Usamos el clon EST (Expressed Sequence Tag) RH58005 correspondiente a este gen, para comprobar su patrón de expresión y seguir el desarrollo de los nefrocitos desde la formación del primordio (de Velasco et al., 2006) (Figura 13). Usando estos marcadores comprobamos que efectivamente, *duf* y *sns* están presentes en los nefrocitos. Así, Sns colocaliza con HRP y *duf* colocaliza con *CG32094*

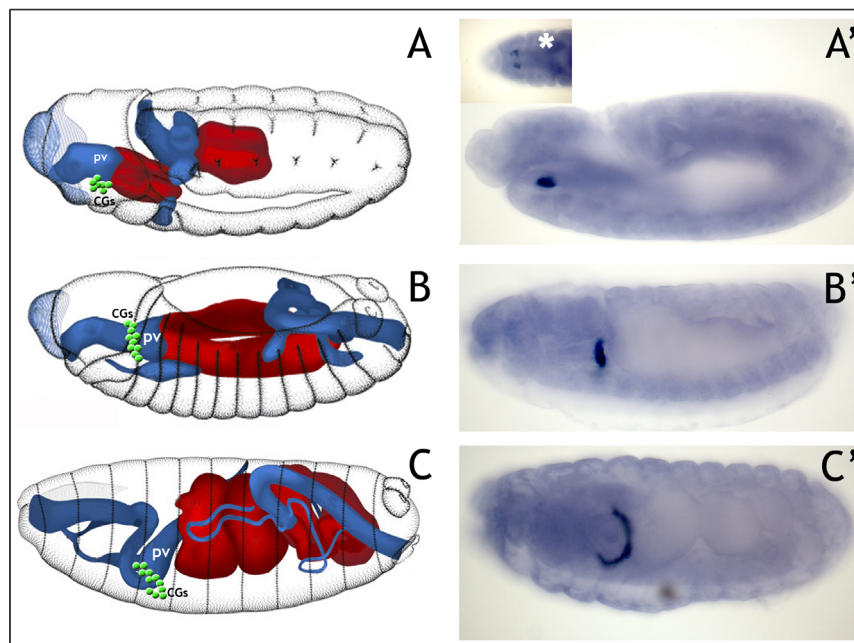


Figura 13.- Patrón de expresión embrionario del gen *CG32094*. (A-C) Esquemas de los estadios 11, 13 y 16 modificados del “Atlas of *Drosophila* development” (Hartenstein, 1993) en los que se representa en verde la localización de los nefrocitos en guirnalda (GCs) asociados al proventrículo (pv). (A'-C') Patrón de expresión del gen *CG32094* revelado por hibridación *in situ*. (A') En el estadio 11, *CG32094* se expresa en dos grupos de células situados en la parte anterior del embrión, a ambos lados del proventrículo (* detalle de dicha expresión, visión dorsal). (B') en estadio 13, ambos grupos confluyen y forman una guirnalda de células en forma de U que rodea al esófago. (C') Expresión del gen *CG32094* en estadio 16, mostrando que la disposición de los nefrocitos en guirnalda alrededor del esófago y justo anterior al proventrículo, se mantiene durante los movimientos morfogénicos del sistema digestivo.

(Figura 14). Para analizar en detalle el patrón de expresión y la localización de la proteína Duf en los nefrocitos, generamos dos anticuerpos: uno que reconoce su dominio intracelular (anti-

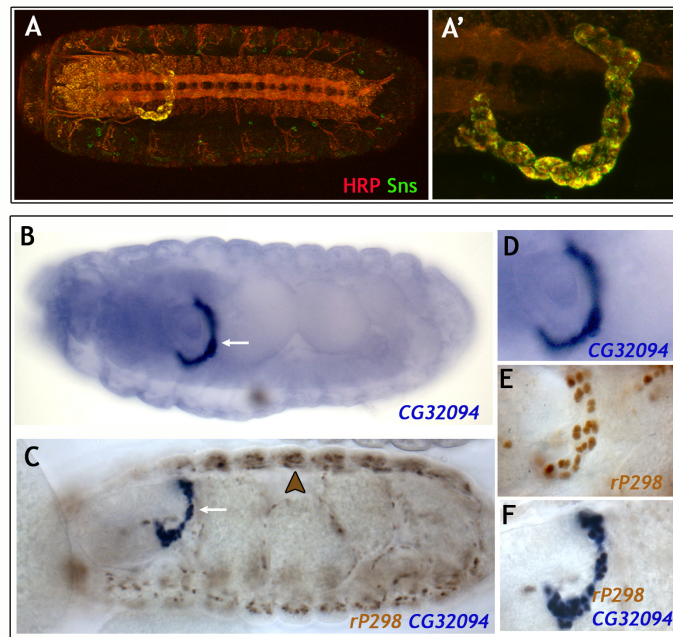


Figura 14.- *duf* y *sns* se expresan en los nefrocitos en guirnalda. (A, A') Embrión en estadio 16 mostrando colocalización de Sns (verde) con HRP (rojo) en los nefrocitos. **(B-F)** Coexpresión de *duf* (revelado por la expresión de β -Galactosidasa en la línea *rP298*, marrón C, E-F) con *CG32094* (detectado por hibridación *in situ*, azul, B-D, F), en nefrocitos en guirnalda de embriones de estadio 16.

Duf_{int}, ver materiales y métodos) y otro el dominio extracelular (anti-Duf_{ext}). Para detectar Sns se utilizó un anticuerpo contra la región citoplasmática de la proteína, cedido por Susan Abmayr. Haciendo uso de ellos, comprobamos que Duf y Sns colocalizan en la membrana de los nefrocitos durante estadios embrionarios y larvarios, aunque el patrón de expresión varía a lo largo de los diferentes estadios como se describe a continuación (Figura 15). La expresión de ambas proteínas comienza en estadio 11 embrionario en el primordio de los nefrocitos, acumulándose en la membrana de los puntos de contacto celular (Figura 15A, A'). En el estadio 13 tardío, en el cual los nefrocitos forman una guirnalda alrededor del esófago, Duf y Sns siguen acumulándose en estos puntos de contacto (Figura 15B, B'). Durante los estadios 15-16 ambas proteínas se detectan en regiones adicionales de la membrana (Figura 15C, C'), hasta que en el estadio 17, Duf y Sns perfilan por completo el contorno de la célula (no mostrado). En el tercer estadio larvario, los nefrocitos solo se mantienen unidos por la membrana basal rica en colágeno IV que los envuelve, y por su adherencia a un cable de actina. En este estadio Duf y Sns colocalizan en toda la superficie celular (Figura 15D-G), sin embargo, la observación detallada revela que ambas proteínas presentan un patrón discontinuo en la membrana, que tiene apariencia acanalada (Figura 15F).

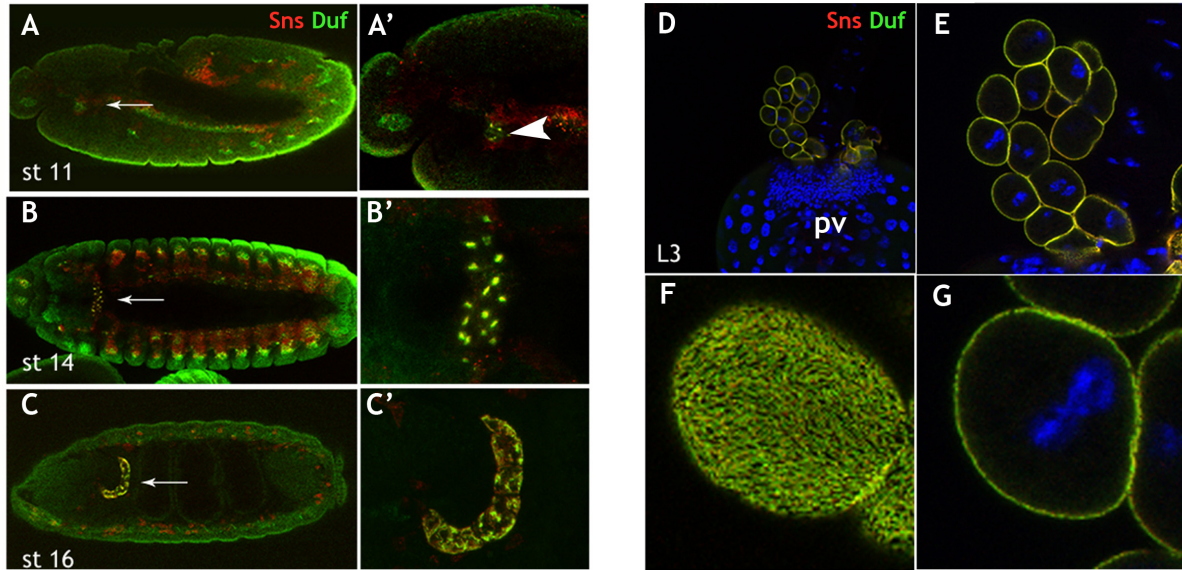


Figura 15.- Patrón de expresión de Duf y Sns en nefrocitos en guirnalda. (A-C') Evolución temporal del patrón de expresión de Duf (verde) y Sns (rojo) en nefrocitos en guirnalda embrionarios usando anticuerpos contra ambas proteínas (flechas en A-C). En estadio 11 ambas proteínas colocalizan en el primordio de los nefrocitos, acumulándose en las membranas en las zonas de contacto celular (amarillo, punta de flecha en A'). Esta localización se conserva en estadio 14 (B') y cambia en estadio 16, en el que la distribución se extiende a la totalidad de la membrana celular (C'). (D-G) Colocalización de Duf y Sns en la membrana de nefrocitos de tercer estadio larvario. La observación detallada de estas células muestra que la distribución de Duf y Sns no es homogénea y revela la naturaleza acanalada de la superficie celular (F). Las células están contrateñidas con Topro para visualizar los núcleos, revelando la condición binucleada de las mismas (E, G).

Dado la colocalización a lo largo del desarrollo de Duf y Sns en nefrocitos, nos preguntamos si sus parálogos Rst y Hbs, respectivamente, también se expresaban en las mismas y si en este caso presentaban patrones de expresión complementarios. Para ello, hicimos hibridaciones *in situ* con sondas marcadas dirigidas contra el ARN de *rst* y de *hbs* en estadios embrionarios y en nefrocitos en guirnalda de tercer estadio larvario. Observamos que estos genes no se expresan en los nefrocitos durante el desarrollo embrionario (Figura 16A-C),

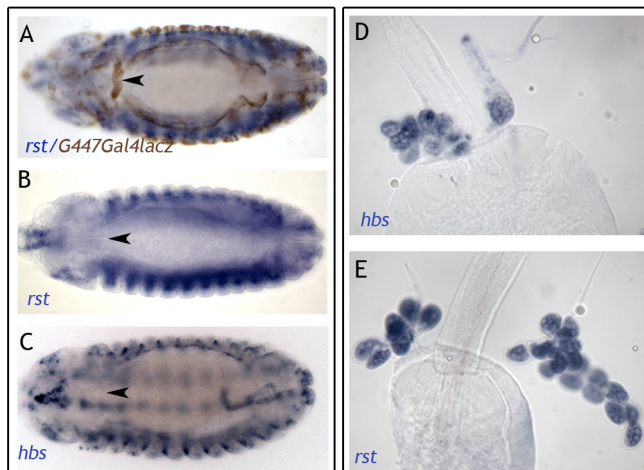


Figura 16.- Patrón de expresión de *rst* y *hbs* en nefrocitos en guirnalda. (A-C) Patrón de expresión de *rst* (A, B) y *hbs* (C) en estadio 13 embrionario, revelado por hibridación *in situ*. Las puntas de flecha señalan la posición de los nefrocitos en guirnalda, mostrando la ausencia de expresión de ambos genes en los mismos. (D, E) Expresión de *hbs* (D) y *rst* (E) en nefrocitos de larvas de tercer estadio. En A la localización de los nefrocitos se visualiza en marrón con un anticuerpo anti- β -galactosidasa, en un embrión *G447GAL4::UASlacZ*.

pero que sí están presentes en todos los nefrocitos en guirnalda de la larva (Figura 16D, E).

1.2. Generación de deficiencias *dumbfounded*

Para estudiar el papel de *duf* en los nefrocitos en guirnalda decidimos generar deficiencias que eliminaran sólo a *duf*, ya que la única deficiencia disponible hasta el momento era la deficiencia *Df(1)w^{67k30}*, que también deleciona a su parálogo *rst* (Ruiz-Gómez et al., 2000). La deficiencia *Df(1)w^{67k30}* es letal embrionaria y tiene fenotipo de falta de fusión. Pensamos que, puesto que durante la miogénesis *duf* y *rst* cumplen funciones redundantes (Strunkelnberg et al., 2001), en las nuevas deficiencias de *duf* generadas el proceso de fusión sería llevado a cabo por *rst*, de modo que los individuos deficientes para *duf* llegarían a adultos.

Usamos el método descrito en Parks et al., 2004 para obtener estas deficiencias por recombinación de elementos P con secuencias FRT (Parks et al., 2004; Thibault et al., 2004). En la región de 3 Kb comprendida entre el extremo 3' de *duf* y el gen más proximal, *Notch*, sólo encontramos un elemento P disponible: *PBac (RB)^{e03354}*. En el extremo 5' de *duf* buscamos inserciones de elementos P que fueran compatibles con *PBac (RB)^{e03354}* y elegimos *PBac(RB)*

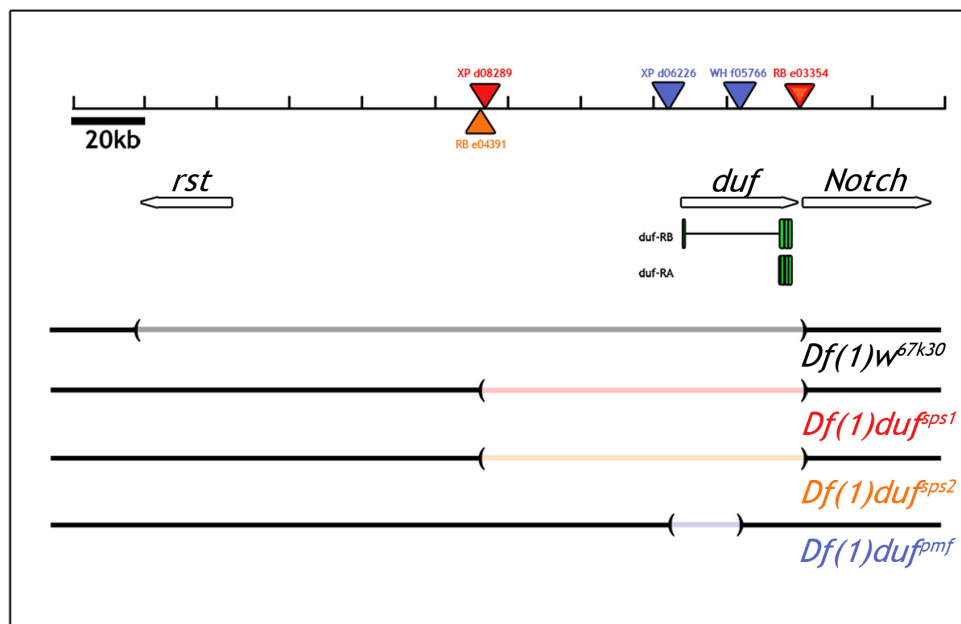


Figura 17.- Mapa molecular de las deficiencias *duf*. Representación esquemática de 240kb de la zona de ADN de la región cromosómica del cromosoma X que abarca a los genes *rst*, *duf* y *Notch* (flechas blancas que señalan la dirección de transcripción del gen). Mediante triángulos se representan los elementos P usados para la generación de las distintas deficiencias, indicados con el mismo código de color. En el caso de las deficiencias *Df(1)duf^{ps1}* y *Df(1)duf^{ps2}* se usó el mismo elemento P insertado en la región 3' de *duf*, *PBac(RB)^{e03354}* (rojo/naranja) en su generación. Ambas deficiencias eliminan los dos transcritos de *duf*, *duf-RA* y *duf-RB* (verde). La deficiencia *Df(1)duf^{pmf}* sólo afecta al transcrito *duf-RB* y elimina 1,5kb de ADN de la región 5' promotora del gen. También se representa la deficiencia *Df(1)w^{67k30}* que deleciona *rst* y *duf*.

e04391 y *P(XP)^{d08289}* (Figura 17). Usando estas combinaciones de elementos P obtuvimos las deficiencias *Df(1)duf^{sps1}* y *Df(1)duf^{sps2}*. En la figura 17 también se representa la deficiencia, *Df(1)duf^{pmf}* (generada en el laboratorio por P.Martín) y que se realizó también mediante este método usando los elementos P, *P(XP)^{d06226}* y *PBac(WH)⁰⁵⁷⁶⁶*.

Como se muestra en la figura 17, ambas deficiencias *Df(1)duf^{sps1}* y *Df(1)duf^{sps2}* eliminan los dos transcritos de *duf*: *duf-RA* y *duf-RB* y se expanden desde 18Kb de ADN genómico “upstream” del primer exon del transcrito *duf-RB*, hasta 1,3 Kb “downstream” de *duf*, dejando 0.7Kb de zona reguladora de *Notch* intactas. Ambas presentan el mismo fenotipo, por lo que todos los estudios de falta de función los hemos realizado con la deficiencia *Df(1)duf^{sps1}*. El análisis molecular de las deficiencias se llevó a cabo por PCR (materiales y métodos), mostrándose en la figura 18B un ejemplo representativo. Se comprobó la delección del DNA de la región codificante de *duf* en la deficiencia *Df(1)duf^{sps1}* por la ausencia de dos productos de PCR que se amplifican en el tipo silvestre. Estos resultados se corroboraron mediante hibridaciones *in situ* con sondas específicas para *duf* (Figura 18A) y *rst* (Figura 18C), en embriones hemicigóticos para la *Df(1)duf^{sps1}*. Así, comprobamos que *duf* no se expresa en estos embriones y que la expresión de *rst* no se modifica.

Por otro lado, la *Df(1)duf^{pmf}* sólo afecta al transcrito *duf-RB*, pero podría estar afectando a la región reguladora de *duf* y alterar su expresión en el mesodermo somático o en los nefrocitos, por lo que quisimos analizar si el patrón de *duf* era semejante al observado en condiciones silvestres. Las hibridaciones *in situ* con una sonda de ARN para *duf* en embriones hemicigóticos *Df(1)duf^{pmf}* revelan una disminución en los niveles de expresión de *duf* en los músculos dorsales (Figura 18D). De igual forma, comprobamos que la expresión de Duf en los nefrocitos de tercer estadio larvario, detectados con el anticuerpo anti-Duf_{int}, estaba afectada como se muestra en la figura 19 por la ausencia de Duf en amplias regiones de la membrana. Por lo tanto, la región de DNA delecionada en la deficiencia *Df(1)duf^{pmf}* debe contener zonas reguladoras necesarias para la correcta expresión de *duf* en los nefrocitos y en la región más dorsal del mesodermo somático.

Los individuos de la deficiencia *Df(1)duf^{pmf}* son viables y fértiles. Sin embargo, en la deficiencia *Df(1)duf^{sps1}* las hembras son prácticamente estériles, aunque viven en homocigosis.

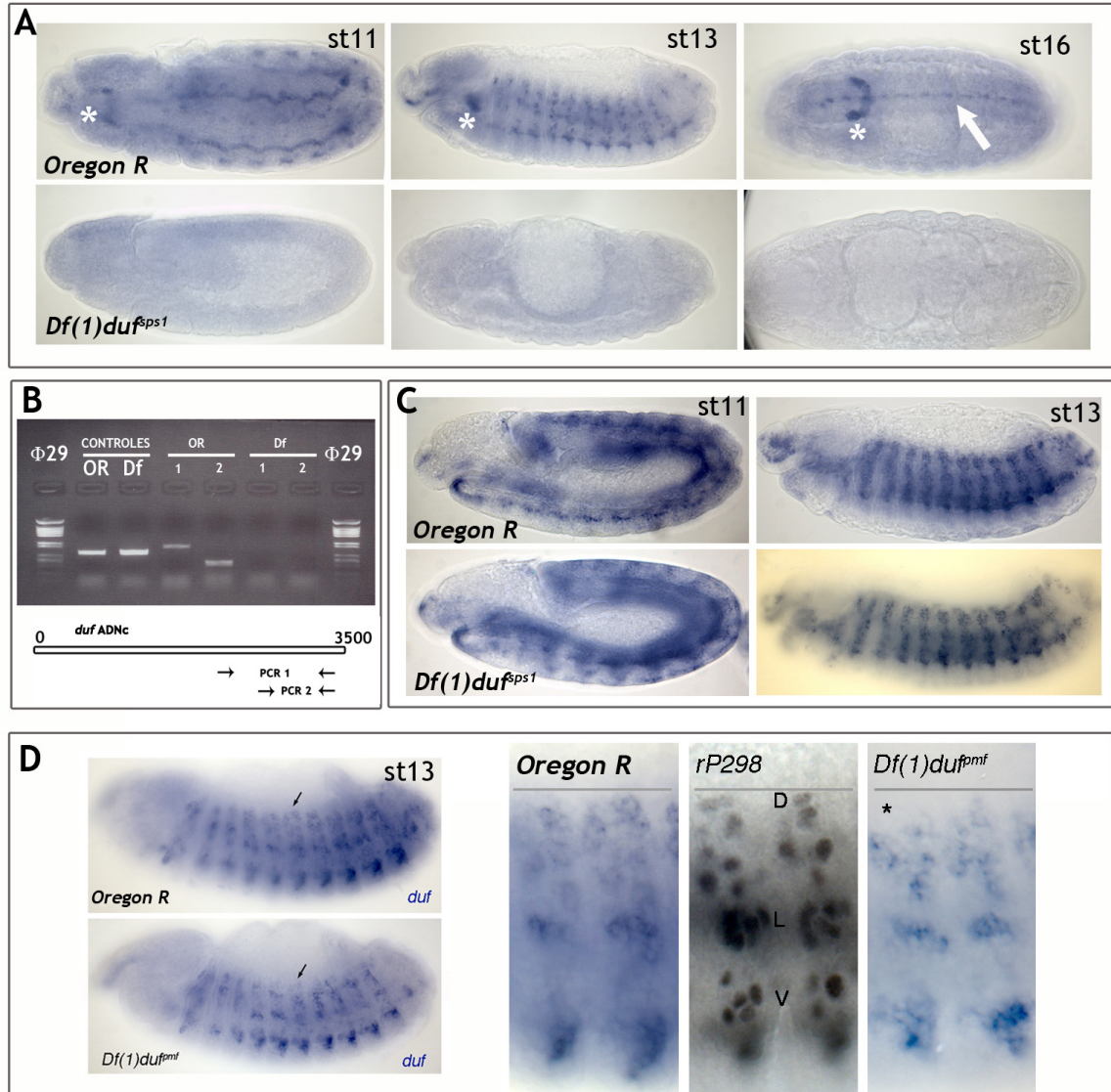


Figura 18.- Análisis de las deficiencias *Df(1)duf^{ps1}* y *Df(1)duf^{pmf}*. (A-C) Caracterización de la deficiencia *Df(1)duf^{ps1}*. (A) Hibridación *in situ* con una sonda de *duf* en embriones silvestres (paneles superiores) y *Df(1)duf^{ps1}* (paneles inferiores) en estadios similares de desarrollo, mostrando la falta de expresión de *duf* en *Df(1)duf^{ps1}*. Los asteriscos señalan la posición de los nefrocitos en guirnalda y la flecha la expresión de *duf* en la línea media del sistema nervioso. (B) Gel representativo de la caracterización molecular de *Df(1)duf^{ps1}* por análisis de PCR sobre ADN de *duf*. Los carriles 1 y 8 corresponden al marcador de tamaño, el 2 y el 3 son PCRs controles, usando DNA de una región del cromosoma 2. Los carriles 4, 5, 6 y 7 son PCRs correspondientes a la región codificante de *duf*, indicadas en el esquema inferior, para el ADN genómico de OR (4 y 5) y de la *Df(1)duf^{ps1}* (6 y 7). Así, podemos comprobar que en la deficiencia *Df(1)duf^{ps1}* se ha eliminado la región codificante de *duf*. (C) La expresión de *rst* (tipo silvestre en paneles superiores) no se afecta en embriones *Df(1)duf^{ps1}* (paneles inferiores). (D) Hibridación *in situ* de *duf* en embriones *Df(1)duf^{pmf}*. Se muestran embriones de estadio 13 de tipo silvestre (OR) y *Df(1)duf^{pmf}*, y detalles de los mismos, para mostrar la ausencia de expresión de *duf* en los músculos más dorsales (asterisco) y su disminución en dorsolaterales (flechas). También se muestra un detalle de la expresión de *duf* en *rP298*, como referencia de los grupos de músculos dorsales (D), laterales (L) y ventrales (V).

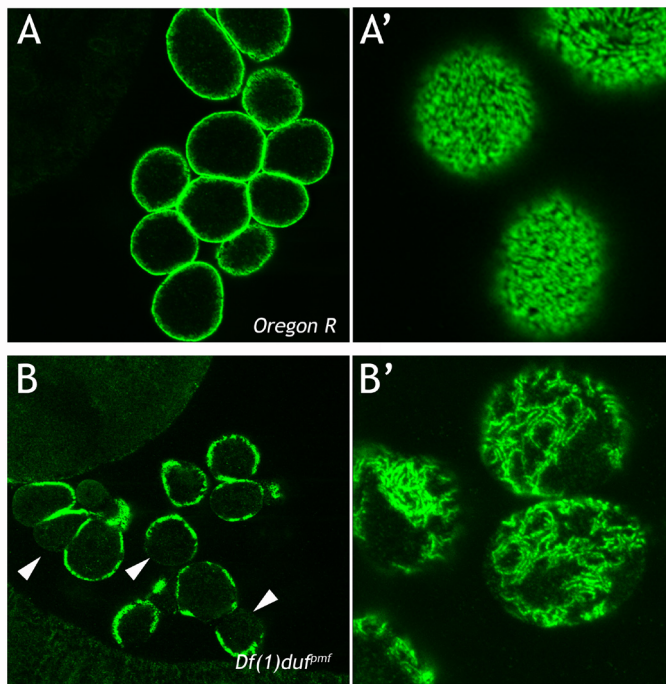


Figura 19.- Expresión de Duf en nefrocitos en guirnalda de la *Df(1)duf^{pmf}*. (A-B') Patrón de expresión de Duf revelado con el anticuerpo anti-Duf_{int} en los nefrocitos de tercer estadio larvario del tipo silvestre (A-A') y *Df(1)duf^{pmf}* (B-B'). (A, B) Secciones ópticas a nivel medio de GCs mostrando la continuidad de la expresión de Duf perfilando la membrana celular en el tipo silvestre (A) y el patrón discontinuo en *Df(1)duf^{pmf}* (puntas de flecha en B). (A', B') Las secciones ópticas superficiales muestran un patrón ribeteado continuo de Duf en GCs de tipo silvestre (A') y su ausencia en regiones extensas en *Df(1)duf^{pmf}*.

1.3. Análisis fenotípico de *dumbfounded* y *sticks and stones* en los nefrocitos en guirnalda

1.3.1. La función de *dumbfounded* en nefrocitos no está relacionada con el proceso de fusión

La naturaleza binucleada de los nefrocitos en guirnalda y el hecho de que expresen Duf y Sns, proteínas implicadas en la fusión de mioblastos, sugería la posibilidad de que los nefrocitos maduros procedieran de la fusión de dos células precursoras. Para determinar si la presencia de dos núcleos se debía a un proceso de fusión ó alternativamente a división nuclear no acompañada de citoquinesis, cuantificamos el número de núcleos por nefrocito en diferentes mutantes de fusión y de ciclo celular. Así, en los mutantes de fusión *mioblast city* (*mbc^{A860}*), *rolling pebbles* (*rols^{A1098}*), *Df(1)w^{67k30}* (*rst, duf*) (Figura 20A. B, D), *sns^{XB3}*, *titin^{A42}* y *myoblasts incompetent* (*minc^{A388}*) (no mostrado), donde los músculos son mononucleados, los nefrocitos contienen dos núcleos (Figura 20A). Sin embargo, en mutantes de *ciclina A* (*cycA^{C551}*, Figura 20E) que afecta el ciclo celular, los nefrocitos, sólo contienen un núcleo, mientras que los músculos son multinucleados. Nuestros datos indican que la naturaleza binucleada de los nefrocitos no se modifica en mutantes de los genes implicados en la fusión de mioblastos, y sugiere que la presencia de dos núcleos por célula podría resultar de un proceso de división con ausencia de citoquinesis.

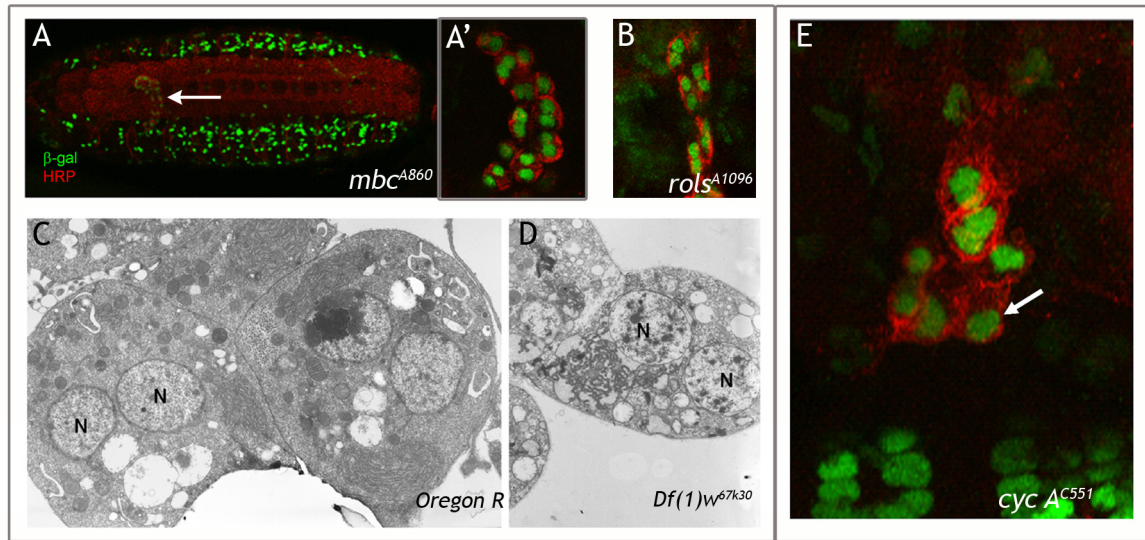


Figura 20.- Los nefrocitos en guirnalda son binucleados en mutantes de fusión. (A-E) En embriones mutantes para genes de fusión como *mbc*^{A860} (A, A'), *rls*^{A1096} (B) y *duf* (*Df(1)w*^{67k30}, D) los nefrocitos son binucleados, mientras que en mutantes que afectan el ciclo celular, como *cycA*^{C551} (E), sólo contienen un núcleo (flecha). Los nefrocitos en guirnalda están visualizados por la expresión de HRP (rojo) y anti-βgalactosidasa (verde), en fondo *rP298* en A-B, E, mientras que C y D son micrografías electrónicas de transmisión (N=núcleo). En todos los casos se presentan embriones de estadio 15-16. A' es un detalle de la zona indicada en A (flecha).

1.3.2. Análisis ultraestructural de los nefrocitos en guirnalda durante el desarrollo

La ultraestructura de los nefrocitos ha sido descrita en diferentes especies de insectos (ver introducción). En todas ellas se ha descrito la presencia de invaginaciones de la membrana plasmática de los nefrocitos que penetran hacia el interior de la célula dando lugar a cavidades llamadas canales de laberintina. El citoplasma que rodea a las aberturas de la membrana plasmática es denso a los electrones y en el caso de *Drosophila*, se ha observado la presencia de un fino puente de material extracelular que se expande de un lado al otro de la abertura (Kosaka and Ikeda, 1983).

La presencia de material denso a los electrones en la entrada de los canales de laberintina, nos sugirió la posibilidad de que esta estructura fuera similar a los diafragmas de filtración de los podocitos, por lo que decidimos realizar un seguimiento en detalle de la ultraestructura de los nefrocitos en guirnalda de *Drosophila* durante el desarrollo. Nos centraremos en las estructuras asociadas a la membrana debido a que Duf y Sns se localizan en ésta y a que su patrón evoluciona desde cúmulos en zonas de contacto celular en estadios tempranos, a una distribución discontinua a lo largo de toda la membrana (apartado 1.1).

A) Análisis ultraestructural de los nefrocitos en guirnalda durante el desarrollo en el tipo silvestre

En embriones de estadio 13-14 los nefrocitos en guirnalda se encuentran muy próximos y mantienen varias zonas de contacto celular ricas en material denso a los electrones, que se han descrito como uniones adherentes (Tepass and Hartenstein, 1994) y asteriscos en Figura 21A, A'). En estos estadios tempranos podemos observar la presencia de regiones de membranas separadas entre células vecinas, que están limitadas por estas uniones adherentes (Figura 21A, A'). En los lugares en los que están separándose las membranas, se empieza a depositar la membrana basal y comienzan a generarse las invaginaciones superficiales que preceden a la formación de canales de laberintina (Figura 21B). En embriones de estadio 15 los nefrocitos se van separando a la vez que siguen unidos al proventrículo, quedando mayor volumen de superficie celular expuesta a la hemolinfa circulante. En las regiones expuestas observamos una gran profusión de canales de laberintina que no están presentes en las zonas de contacto celular (puntas de flecha en Figura 22A). La observación detallada de la entrada

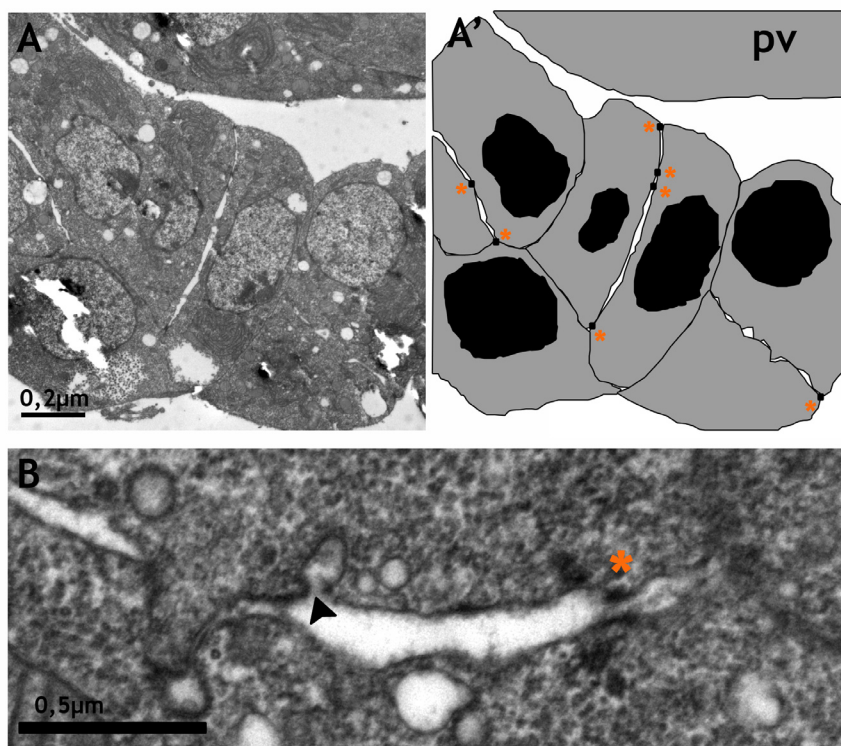


Figura 21.- Ultraestructura de los nefrocitos en guirnalda en embriones de estadio 13. (A, A') Micrografía de transmisión electrónica y esquema correspondiente, mostrando la ultraestructura de los nefrocitos en estadio 13. Los nefrocitos están muy próximos entre sí manteniendo zonas de contacto, asociadas a material denso a los electrones a ambos lados de las membranas (asteriscos, pv; proventrículo). **(B)** Detalle de una zona de aposición entre dos nefrocitos en la que se observa la presencia de uniones adherentes cerca de las zonas de contacto celular (asterisco) y la aparición de una invaginación en la membrana que precede a la formación de un canal de laberintina (punta de flecha negra). Se observan trazas de membrana basal que se ha depositado en esta zona. Las barras corresponden a 2μm en A y 0,5μm en B.

de estos canales revela la presencia de zonas densas a los electrones, situadas a ambos lados de la abertura y conectadas por estructuras filamentosas, que por su analogía a los diafragmas de filtración de los podocitos denominaremos diafragmas de filtración de los nefrocitos (cabeza de flecha en Figura 22A').

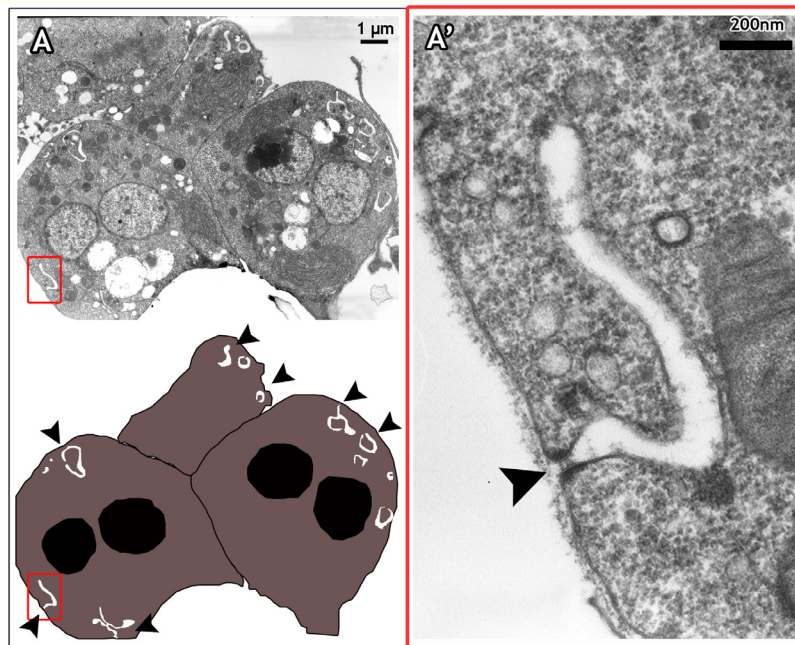


Figura 22.- Ultraestructura de los nefrocitos en guirnalda en embriones de estadio 15. (A) Micrografía de transmisión electrónica de las GCs y esquema, mostrando tres nefrocitos en guirnalda. Observar la aparición de gran número de canales de laberintina (puntas de flecha) en las superficies expuestas al medio, en contraposición con las zonas de contacto celular. (A') Detalle de la región encuadrada en A, en la que se muestra un diafragma de filtración, revelado por la presencia de filamentos que cubren la abertura de los canales extendiéndose entre

dos regiones densas a los electrones (punta de flecha). Las barras corresponden a 1 μm en A y 0,2 μm en A'.

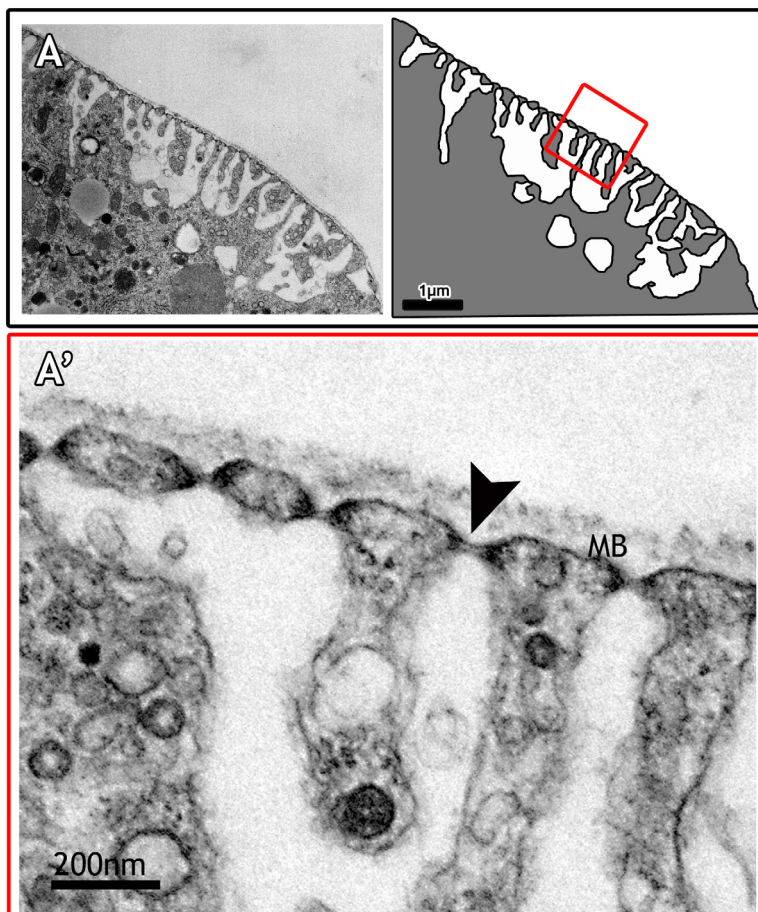


Figura 23.- Ultraestructura de los nefrocitos en guirnalda en tercer estadio larvario. (A) Micrografía de transmisión electrónica y esquema de una región de la membrana del nefrocito, en la que se muestra toda la superficie celular cubierta por canales de laberintina limitados por diafragmas de filtración. (A') Ampliación de la región encuadrada en A mostrando la membrana basal (MB), que rodea toda la célula, y los filamentos de los diafragmas de filtración (punta de flecha). Las barras corresponden a 1 μm en A y 0,2 μm en A'.

En nefrocitos del tercer estadio larvario no se observan uniones adherentes entre las células y toda la superficie de membrana expuesta está ocupada por canales de laberintina cerrados por diafragmas de filtración y cubierta por una membrana basal bien definida (Figura 23). En este estadio la extensión del diafragma que cierra la abertura de los canales es de unos 40nm, igual que los diafragmas de filtración de los podocitos.

B) Análisis ultraestructural de los nefrocitos en guirnalda en deficiencias *dumbfounded*

Estudiamos la falta de función de *duf* en estadios embrionarios usando la deficiencia *Df(1)w^{67k30}*. El análisis ultraestructural de nefrocitos de estadio 15 revela una ausencia total de canales de laberintina (Figura 24A, A') y de diafragmas de filtración (Figura 24A'), ambos frecuentes en el tipo silvestre en este estadio (comparar con Figura 22A, A'). Para el análisis en estadios larvarios usamos la deficiencia *Df(1)duf^{8ps1}*. Lo primero que observamos al diseccionar los nefrocitos de las larvas *Df(1)duf^{8ps1}* es que en lugar de estar dispuestas en una ristra de células individuales alrededor del esófago, forman agregados celulares. Las micrografías electrónicas de transmisión nos revelan cambios muy relevantes en la ultraestructura de las membranas celulares. Así, en las zonas de membrana expuestas a la hemolinfa, no se observan ni canales, ni estructuras relacionadas con diafragmas de filtración (Figura 24C). Ocasionalmente se observan invaginaciones de la membrana que no están limitadas por condensaciones ni filamentos, y que por su aspecto, recuerdan a vesículas de Clatrina, relacionadas con endocitosis (flecha en Figura 24D'). Además, la membrana basal está más engrosada y contiene material mas denso que en el tipo silvestre (comparar barras amarillas en la Figura 24B y C). Por otro lado, los nefrocitos de tercer estadio larvario en la deficiencia *Df(1)duf^{8ps1}* mantienen regiones extensas de contacto celular (Figura 24D). Las membranas en estas regiones con frecuencia presentan zonas de material denso a los electrones, que ultraestructuralmente se asemejan a las uniones adherentes típicas de estadios embrionarios tempranos (asteriscos en Figura 24D', comparar con Figura 21A') y a las "placas de adhesión" que se forman entre mioblastos en estadios tempranos del proceso de fusión (Doberstein et al., 1997, ver discusión).

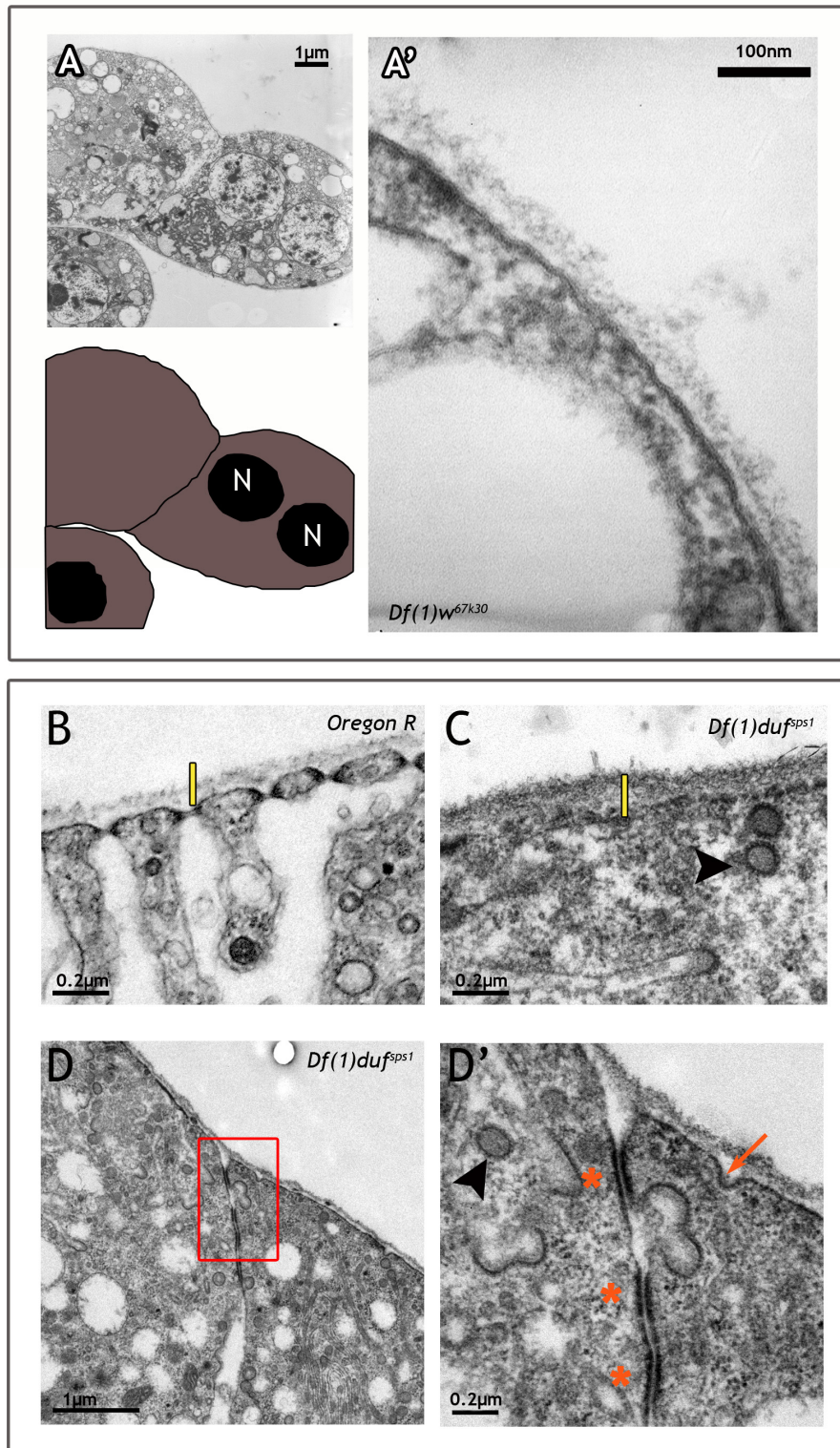


Figura 24.- Fenotipo de falta de función de *dumbfounded* en nefrocitos en guirnalda. (A, A'), Imagen, esquema y ampliación, de nefrocitos de embriones de estadio 15 de la deficiencia, *Df(1)w67k30*. En ausencia de *duf*, los nefrocitos son binucleados (A, N= núcleo) y no se forman canales ni diafragmas de filtración. (B-D') Micrografías de transmisión de nefrocitos de tercer estadio larvario del tipo silvestre (B) y *Df(1)dufsp1* (C-D'). Notar la ausencia de canales limitados por diafragmas de filtración, y el engrosamiento de la membrana basal en ausencia de Duf en las zonas de membrana expuestas (C, comparar con B). En *Df(1)dufsp1* se observan muchas regiones de contacto celular donde son frecuentes la presencia de zonas densas a los electrones (asteriscos en D'). En C y D se observan vesículas de endocitosis maduras (puntas de flechas) y en formación (flecha). El cuadro en D señala la región ampliada en D'.

C) Análisis ultraestructural de los nefrocitos en guirnalda en condiciones de falta de función de *sticks and stones*

Dada la coexpresión de *duf* y *sns* en los nefrocitos, quisimos estudiar si *sns* también era requerido en estas células para la formación del diafragma de filtración. Para ello, usamos el mutante nulo *sns*^{*XB3*} y debido a su letalidad embrionaria generamos líneas transgénicas *UAS-ARNi-sns* para el análisis en estadios larvarios. Estas líneas permiten la atenuación controlada espacial y temporalmente de la función del gen endógeno allí donde se dirige la expresión del UAS, usando la técnica GAL4/UAS (Brand and Perrimon, 1993). Además, dependiendo del sitio de inserción de la construcción UAS en el genoma de *Drosophila*, del número de copias utilizadas y de la temperatura a la que se realiza la sobreexpresión, se modula el grado de atenuación. En nuestro caso, usando *Prospero-GAL4* para dirigir la expresión de la línea *UAS-ARNi-sns-20.1* a 25°C conseguimos bloquear totalmente la función de *sns* en los nefrocitos, no interfiriendo con su función en el mesodermo somático. Asimismo, utilizando la línea *UAS-ARNi-sns2* en las mismas condiciones se atenúa la función de *sns*, pero no se elimina completamente.

Utilizando estas condiciones y por análisis ultraestructurales, pudimos comprobar que al igual que ocurre en mutantes *duf*, la función de *sns* se requiere para la formación del diafragma de filtración tanto en estadios embrionarios (Figura 25A) como larvarios (Figura 25B, C). Así, en embriones se observa que la membrana de los nefrocitos se llega a invaginar en algunas regiones, pero el diafragma de filtración nunca se forma. Lo que resulta más interesante es que atenuando la función de *sns* en estadios larvarios, usando la línea *Prospero-GAL4*, se eliminan los diafragmas de filtración, como se muestra en la figura 25B. Estos datos nos indican que la función de *sns* es necesaria no sólo para la formación, sino también para el mantenimiento de los diafragmas, ya que la línea *Prospero-GAL4* sólo se expresa a partir del estadio 16 en los nefrocitos, cuando los diafragmas ya se han formado. Además, también observamos aglutinamiento de los nefrocitos en ausencia de *sns* que se corresponde con el mantenimiento de regiones amplias de contacto celular que, como en el caso de mutantes *duf*, van asociadas a la presencia de uniones adherentes (asteriscos en Figura 25C).

Luego, *Duf* y *Sns* se requieren para la formación del diafragma de filtración en los nefrocitos. Esto es semejante a lo que ocurre en los podocitos del riñón en los que tanto la falta de NEPH1 como de nephrin conlleva una desestabilización del diafragma de filtración (Donoviel et al., 2001; Kestila et al., 1998).

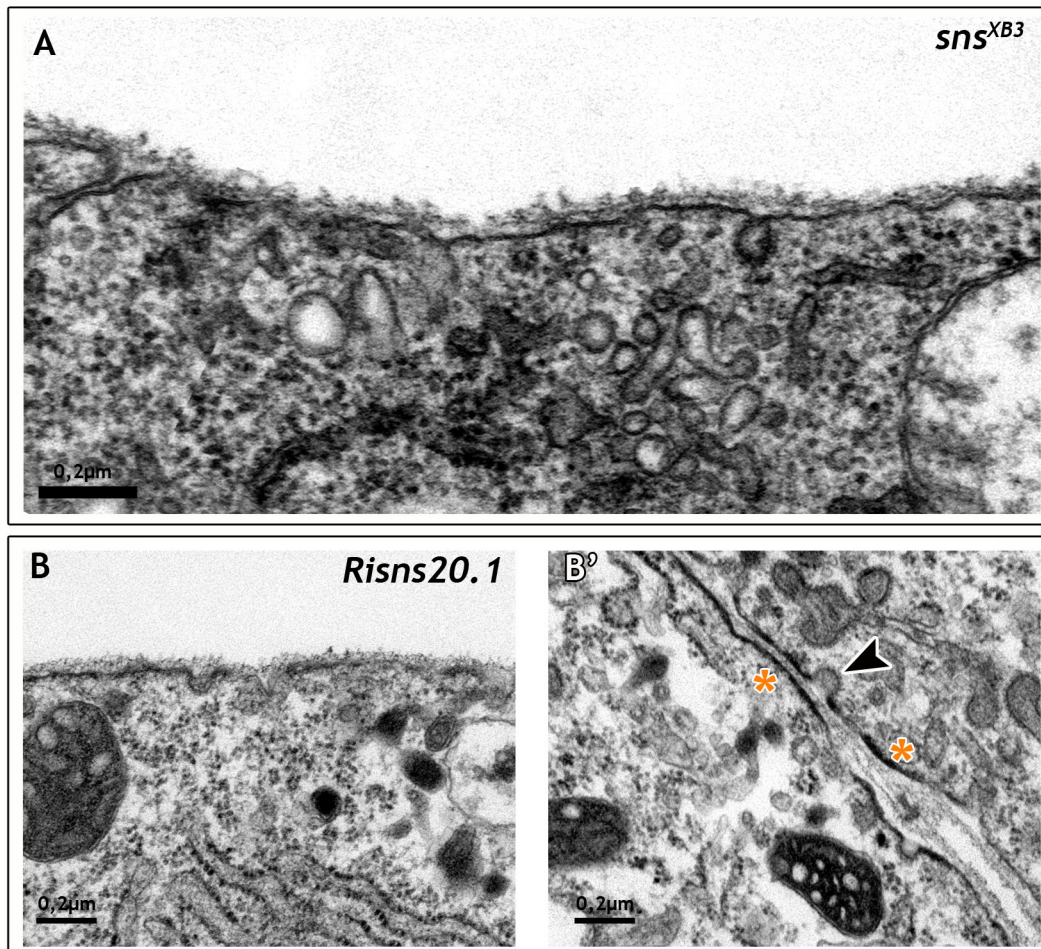


Figura 25.- Fenotipo de falta de función de *sns* en los nefrocitos en guirnalda. (A-C) Micrografías electrónicas de transmisión de las GCs de mutantes *sns^{XB3}*, en estadio 15 embrionario (A) y *Prospero-Gal4::UAS-ARNi-sns-20.1* de tercer estadio larvario (B, C). En ausencia de *sns* no se observan canales de laberintina ni diafragmas de filtración en estadios embrionarios (A) ni en larvarios (B). En las zonas de contacto celular observamos uniones adherentes en las membranas de ambas células (asteriscos naranjas en C). La punta de flecha señala a una vesícula endocítica en formación.

1.3.3. Microscopía electrónica de barrido de los nefrocitos en guirnalda

El hecho de que la colocalización de Duf y Sns en la membrana de nefrocitos de larvas de tercer estadio refleje un patrón ribeteado en la superficie celular (Figura 26A, A'), y la profusión de invaginaciones observadas por microscopía electrónica de transmisión, nos sugería que las discontinuidades en el patrón de expresión podrían deberse a la localización de Duf y Sns en los diafragmas de filtración que cierran la entrada de los canales. Ello implicaría que la superficie de estas células debería ser acanalada, y que en mutantes *duf* y *sns*, al perderse los canales, la superficie debería ser lisa. Efectivamente, el análisis de la superficie de los nefrocitos realizado por microscopía electrónica de barrido reveló su naturaleza acanalada en el tipo silvestre (Figura 26B) y lisa en la deficiencia *Df(1)duf^{sps1}* (Figura 26C). Para descartar la posibilidad de que la falta de rugosidades en los nefrocitos *Df(1)duf^{sps1}* se debiera a

enmascaramiento de éstas por el engrosamiento de la membrana basal, repetimos estos análisis después de tratar las células con collagenasa para eliminar la membrana basal. Así, verificamos la ausencia de canales en la superficie de los nefrocitos *Df(1)duf^{sps1}* (Figura 26E, comparar con D). El análisis de inmunomicroscopía electrónica con anticuerpos anti-Duf (este trabajo) y anti-Sns, realizados por nuestros colaboradores han demostrado que efectivamente Duf y Sns localizan en el diafragma de filtración (Weavers et al., 2009).

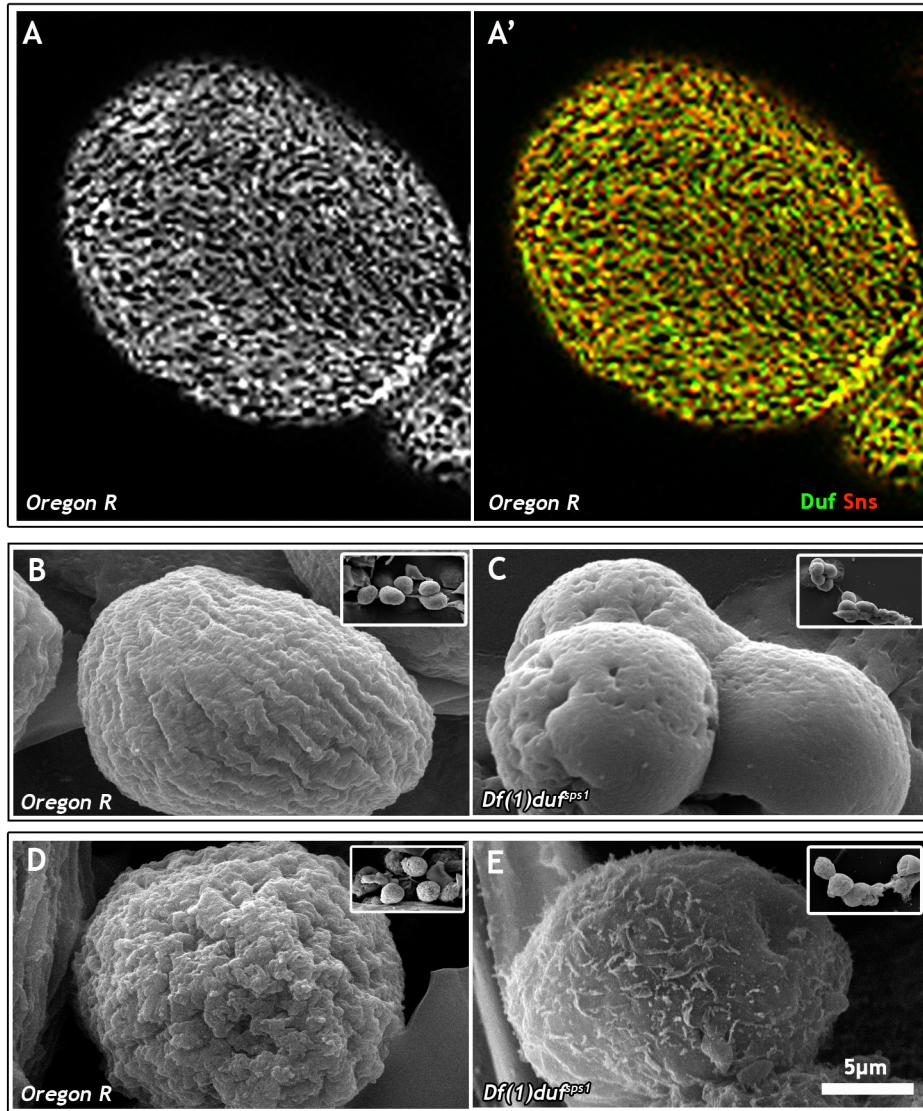


Figura 26.- Análisis de la superficie celular de nefrocitos en guirnalda por microscopía electrónica de barrido. (A, A'), Colocalización de Duf (anti-Duf_{ext}, verde) y Sns (rojo) en nefrocitos de tercer estadio larvario. La expresión de Duf y Sns revela la superficie acanalada de los mismos. Observar, la distribución ribeteada de las proteínas SF-Ig, que coincide con los canales mostrados en B, D. (A) sólo canal verde. (B-E), Micrografías electrónicas de barrido de la superficie celular de nefrocitos de tercer estadio larvario en el tipo silvestre (B, D) e individuos mutantes *Df(1)duf^{sps1}* (C, E). Los paneles muestran detalles de la superficie de nefrocitos individuales seleccionados de los grupos indicados en los respectivos recuadros. Notar el mayor aglutinamiento de los nefrocitos en *Df(1)duf^{sps1}* (recuadro en 26C, por comparación con 26B), y la ausencia de acanalamiento superficial tanto en presencia (Figura 26C) como en ausencia (Figura 26E) de la membrana basal. Observar las trazas de membrana basal aún presentes en E, debido al mayor grosor de ésta en los mutantes.

1.3.4. Interdependencia de Duf y Sns para su estabilidad en la membrana

Duf y Sns colocalizan en la membrana de los nefrocitos donde son componentes estructurales del diafragma de filtración (Weavers et al., 2009) y en cultivos celulares se ha visto que pueden interaccionar tanto homotípica como heterotípicamente (Menon and Chia, 2001; Galletta et al., 2004). Por ello, nos preguntamos cómo se afectaría la localización de Sns en mutantes *duf* y viceversa, condiciones en las que el diafragma de filtración no se forma. En embriones de estadio 16, la expresión de Sns y Duf detectada por tinciones con anticuerpos revela la distribución en filigrana de estas proteínas en las membranas de los nefrocitos (mostrada para Sns en la Figura 27A). La ausencia de cualquiera de las proteínas: Duf ó Sns, en mutantes nulos *sns^{XB3}* y en la deficiencia de *rst* y *duf*, *Df(1)w^{67k30}*, desencadena la deslocalización de la otra proteína SF-Ig. Así, ó se expresa a bajos niveles, distribuyéndose de forma irregular por toda la membrana (Duf en mutantes *sns*, Figura 27B), ó bien, se concentra en cúmulos (Sns en mutantes *duf*, Figura 27C). Así, Duf no depende de Sns para su expresión, pero sí para su localización y/o estabilidad, y viceversa.

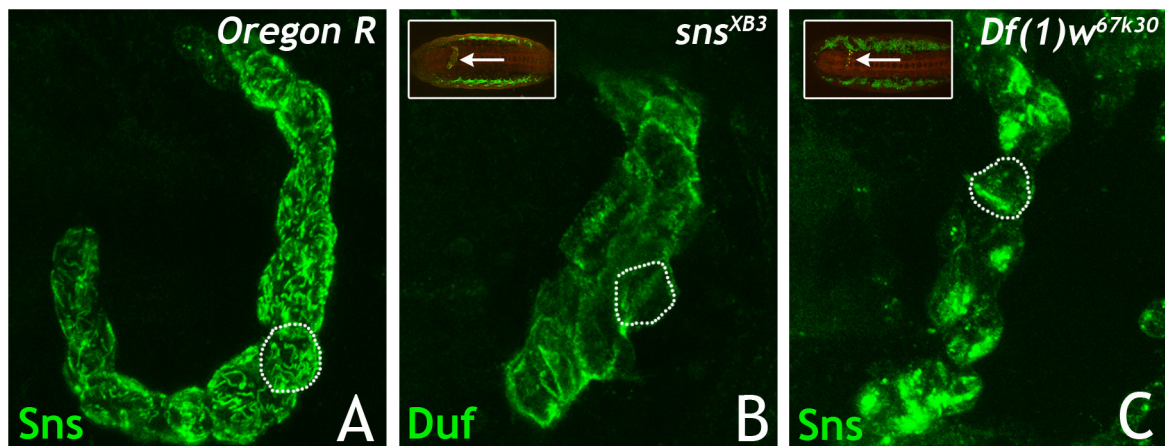


Figura 27.- Interdependencia de Duf y Sns para su correcta distribución en la membrana de los nefrocitos en estadios embrionarios. (A-C) Proyecciones de planos consecutivos de imágenes de microscopía confocal de nefrocitos embrionarios de estadio 16 del tipo silvestre (A), *sns^{XB3}* (B) y *Df(1)w^{67k30}* (C), en las que se muestra la distribución de las proteínas Sns (A, C) y Duf (B). En el tipo silvestre Sns se detecta en un patrón ribeteado, mientras que en *sns^{XB3}* la señal de Duf está muy disminuida e irregular a lo largo de toda la membrana (B). En la deficiencia *Df(1)w^{67k30}* Sns se acumula de forma aberrante (C). En los paneles A-C la zona contorneada dibuja el perfil de una célula tipo, y en los recuadros de B y C las flechas indican la zona de los nefrocitos, ampliada en los paneles correspondientes.

Para profundizar en las bases moleculares de esta interdependencia decidimos repetir estos análisis en estadios larvarios, en los que el mayor tamaño y la accesibilidad de los nefrocitos facilita la interpretación de los resultados. Para eliminar ó atenuar la función de Sns utilizamos *Prospero-GAL4* para dirigir la expresión de *UAS-ARNi-sns20.1* y *UAS-ARNi-sns2* en los nefrocitos a 25°C. De esta manera, cuando eliminamos por completo la

expresión de Sns observamos una desaparición de la señal de Duf (Figura 28B, comparar con 28A). En condiciones hipomorfas (Figura 28C), en las que la expresión de Sns se restringe a zonas discretas de la membrana celular, Duf co-localiza con Sns en estas regiones. Los datos ultraestructurales obtenidos de nefrocitos en las mismas condiciones, sugieren que estos puntos discretos de colocación de Duf y Sns pueden corresponder con diafragmas de filtración, que se observan en ocasiones, en comparación con condiciones silvestres (datos no mostrados). En el caso de la deficiencia *Df(1)duf^{ps1}* Sns también está deslocalizada y muy reducida en la membrana de los nefrocitos (Figura 28E, comparar con 28D), indicando que en ausencia de Duf, y de diafragmas de filtración, Sns no es estable en la membrana de los nefrocitos.

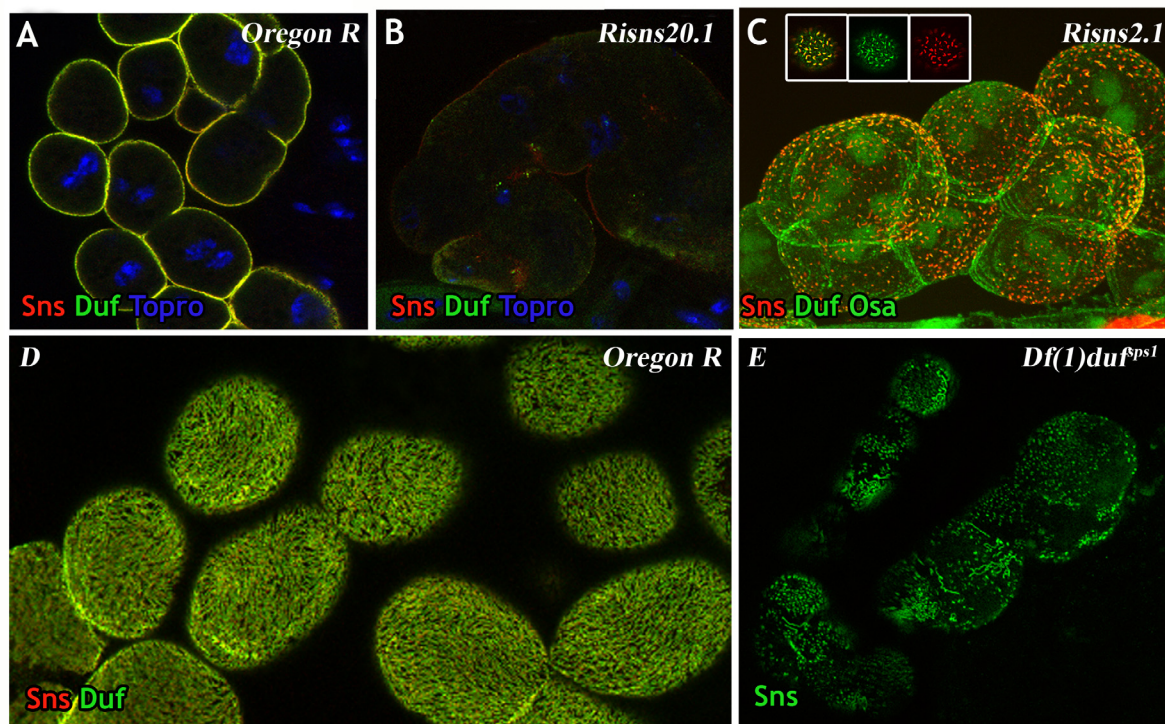


Figura 28.- Interdependencia de Duf y Sns para su correcta distribución en la membrana de las GCs de tercer estadio larvario. (A-E) Imágenes de microscopía confocal de nefrocitos de tercer estadio larvario del tipo silvestre (A, D), *UAS-ARNi-sns* (B, C) y *Df(1)duf^{ps1}* (E). En A, B, D y E se muestra una sección óptica medial (A, B) ó superficial (D, E) y en C la proyección de varias secciones. A-C, Sns se requiere para la estabilidad de Duf en la membrana de los nefrocitos. Duf desaparece en condiciones de eliminación de Sns (B) y se restringe a zonas de presencia de Sns en condiciones de atenuación (C). D, E, En ausencia de Duf, la presencia de Sns queda restringida a zonas discretas de la membrana de los nefrocitos. Para visualizar los núcleos de las GCs se ha usado Topro en A y B y anti-Osa en C. Duf se muestra en el canal verde y Sns en el canal rojo en A-D y verde en E.

1.3.5. Estudio funcional de nefrocitos en guirnalda en mutantes *dumbfounded*

Hasta ahora hemos visto que en los mutantes *dufy sns* la morfología de los nefrocitos está muy alterada, las células mantienen más superficie de contacto que en el tipo silvestre y carecen de diafragmas de filtración. Nos preguntamos como afectarían estos cambios morfológicos y estructurales a la funcionalidad de los nefrocitos, ya que en vertebrados mutaciones en los

genes que codifican para NEPH1 y nephrin que eliminan los diafragmas de filtración, tienen como consecuencia el desarrollo de proteinuria y fallos renales. En *Drosophila* la función de limpieza de la hemolinfa es llevada a cabo por los nefrocitos, que eliminan por endocitosis las sustancias tóxicas y los productos de desecho (King et al., 1966; Kosaka and Ikeda, 1983; Abbey C. Brockhouse, 1999). Su localización es importante para cumplir esta función, ya que están unidas por medio de un cable de actina al proventrículo, quedando suspendidas en la hemolinfa. De esta manera, los movimientos peristálticos de la larva favorecen la entrada continua de hemolinfa a los canales de laberintina a través de los diafragmas de filtración.

Se ha descrito que el exceso de metales pesados se elimina de la hemolinfa por endocitosis en los nefrocitos lo que da un cierto grado de tolerancia a intoxicación por metales pesados a los individuos. Así, al añadir AgNO_3 al alimento de las larvas, los nefrocitos endocitan gran cantidad del metal, que se visualiza por la formación de precipitados de coloración oscura

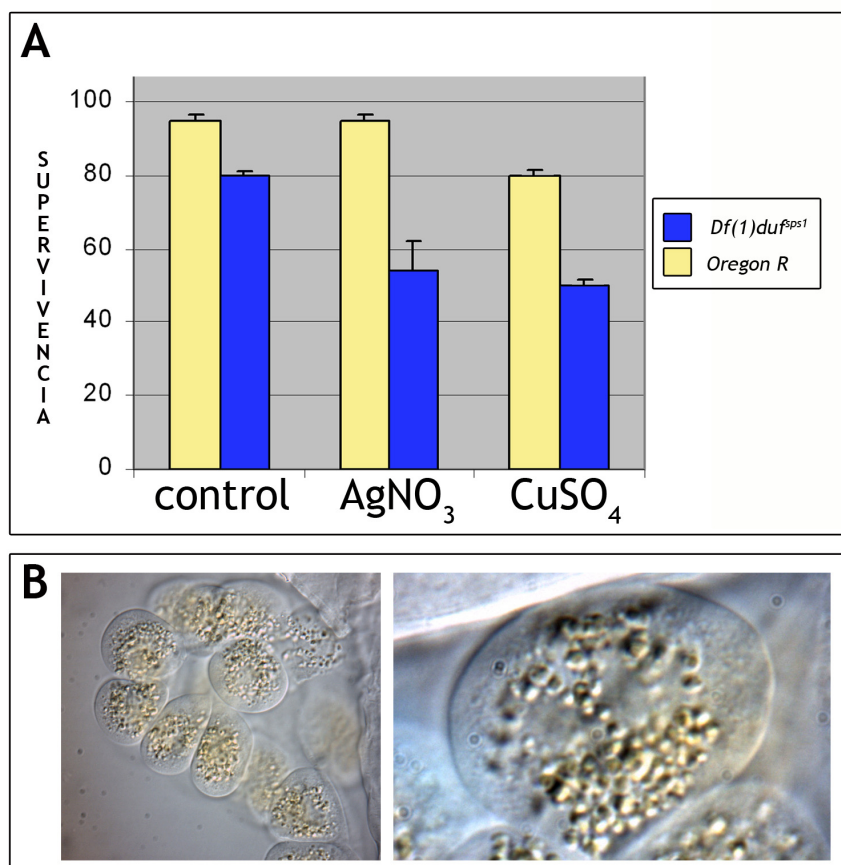


Figura 29.- La tolerancia a la administración de metales pesados en la dieta disminuye en la deficiencia *Df(1)durf^{ps1}*. (A) Representación gráfica de la supervivencia de larvas del tipo silvestre y *Df(1)durf^{ps1}* a alimentación enriquecida en metales pesados. En el eje de abscisas se indica los diferentes tipos de alimentación recibida: el control, la suplementada con plata (AgNO_3 , 0,3mg/ml) y la suplementada con cobre (CuSO_4 , 0,8mM). En ordenadas se indica mediante barras el número de larvas supervivientes sobre 100 testadas en cada caso. **(B)** Imágenes tomadas con óptica Nomarski de nefrocitos diseccionados de larvas de tipo silvestre de tercer estadio alimentadas con la papilla suplementada con plata. Notar la acumulación en vesículas del metal endocitado por los nefrocitos.

(Das et al., 2008). Para analizar la funcionalidad de los nefrocitos quisimos medir el grado de tolerancia a intoxicación por metales pesados en ausencia de diafragmas de filtración en mutantes *duf*, en comparación con el tipo silvestre. Para ello alimentamos a las larvas del tipo silvestre y de la deficiencia *Df(1)duf^{psl}* con papilla enriquecida en cobre (CuSO_4) y plata (AgNO_3) por separado (ver materiales y métodos). En ambos casos comprobamos una disminución en la viabilidad de los mutantes *Df(1)duf^{psl}* en comparación con las larvas de tipo silvestre como se muestra en la figura 29, indicando que la ausencia de diafragmas y de canales de laberintina disminuye la capacidad endocítica de los nefrocitos.

1.3. Componentes del complejo Duf/Sns en nefrocitos en guirnalda

Como ya hemos visto, las proteínas de la SF-Ig Duf y Sns, son necesarias para la formación de músculos multinucleados y del diafragma de filtración de los nefrocitos. El hecho de que la función de estas proteínas en nefrocitos no estuviera relacionada con el proceso de fusión, nos sugería que la cascada de señalización iniciada por la interacción Duf/Sns en nefrocitos podría diferir de la que actúa en los músculos. Para comprobarlo analizamos la expresión de varios componentes de la vía que opera en fusión. Entre ellos Rolling pebbles (Rols), que se une a la región intracelular de Duf y actúa como un adaptador citoplasmático transmitiendo la señal de la membrana al citoesqueleto de actina, Myoblast city (Mbc), que a su vez interacciona con Rols y regula el citoesqueleto de actina y D-Titina. Observamos que ninguno de ellos se expresa en los nefrocitos en guirnalda (Figura 30A).

Por la analogía estructural y funcional que hemos descrito entre los nefrocitos y los podocitos, decidimos comprobar si las proteínas de *Drosophila* ortólogas a los componentes de la vía de señalización de NEPH1 y nephrin estaban presentes en los nefrocitos. Buscamos los ortólogos en *Drosophila* de algunas de estas proteínas como Zonula occludens 1 (ZO-1), podocina y CD2AP (CD2-associated protein). Usamos el programa de búsqueda de alineamientos de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y comprobamos que la proteína con mayor homología a podocina en *Drosophila* es Mec-2, de CD2AP es la proteína Cindr que se traduce del gen predicho *CG31012* (36% de homología) y en segundo lugar la proteína Dap160 (24%). El ortólogo en *Drosophila* de ZO-1 es Polychaetoid (Pyd). Comprobamos que todas ellas se expresaban en nefrocitos (mostrado para Dap160 y Pyd en Figura 30B). Así pues, parece que existe también una homología molecular entre los constituyentes de ambos diafragmas de filtración (Figura 30C). Esta homología se extiende a los reguladores de la expresión de nephrin, ya que Tieg (Cabut), el ortólogo en *Drosophila* del factor de transcripción Wilms tumor 1 (WT-1) (Guo et al., 2004) se expresa en los nefrocitos (Figura 30B), si bien es verdad que su función reguladora sobre Sns no ha sido investigada.

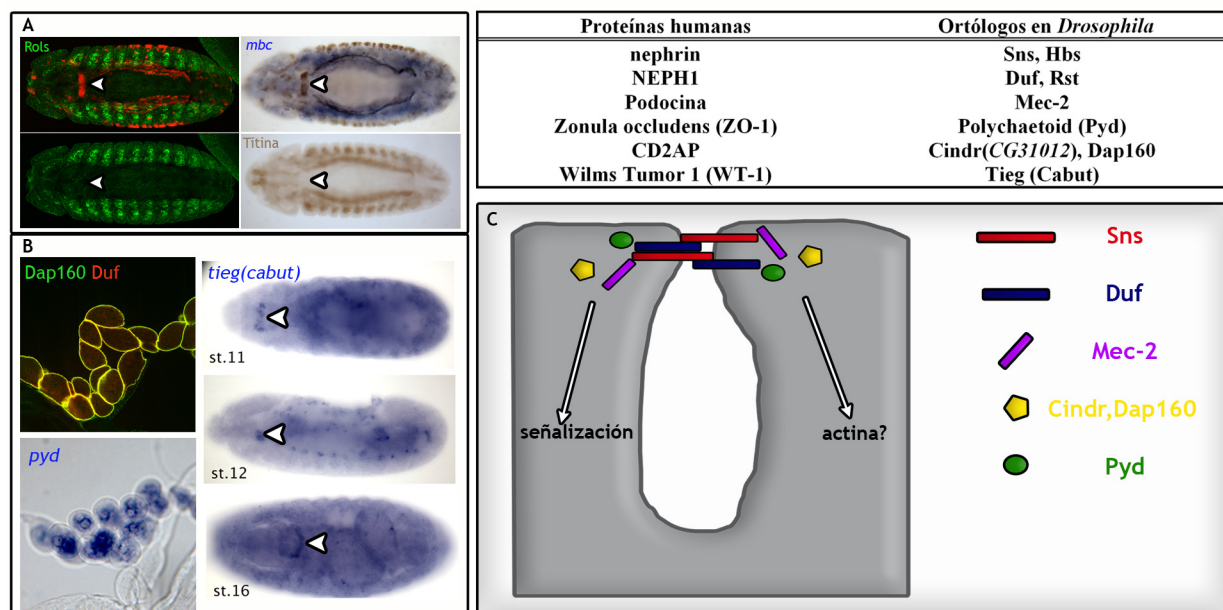


Figura 30.- Identificación de los componentes de la vía de señalización de Duf/Sns en los nefrocitos en guirnalda. (A) Los componentes de la vía de señalización de Duf/Sns en músculos no se expresan en nefrocitos. Se muestran los patrones de expresión embrionaria de Rols, Mbc y de Titina en la línea *G447-GAL4::UAS-βGalactosidasa*. Ninguno de estos genes se expresa en los nefrocitos (puntas de flecha blanca). En los embriones teñidos para Rols y *mbc* los nefrocitos están contra-teñidos con anti-βGal. **(B)** Los ortólogos de los componentes de la vía de señalización de NEPH1/nephrin en podocitos se expresan en los nefrocitos. Dap160 (verde) revelado con el anticuerpo anti-Dap160 colocaliza en la membrana con Duf (rojo). Hibridación in situ de *pyd* en nefrocitos larvarios. Hibridación in situ de *tieg* (*Cabut*) en estadios embrionarios 11, 12 y 16 en los que se señala la expresión en nefrocitos (puntas de flecha). En la tabla se muestran las proteínas de *Drosophila* que se expresan en los nefrocitos y que son ortólogas a las proteínas humanas de los podocitos del riñón. **(C)** Representación esquemática de la vía de señalización de Duf/Sns en nefrocitos. Duf y Sns participan en interacciones homo y heterotípicas en la membrana, donde forman el diafragma de filtración e interactúan con Mec-2, Cindr/Dap160 y Pyd que participarían en señalización y regulación del citoesqueleto (Weavers y cols, 2009).

2. ESTUDIO FUNCIONAL DE POLYCHAETOID EN NEFROCITOS DE DROSOPHILA

En vertebrados se ha descrito la asociación directa de ZO-1 a la región intracelular de NEPH1 (Huber et al., 2003) y se ha sugerido que dicha unión facilitaría el reclutamiento a la membrana de componentes del citoesqueleto de actina (Fanning et al., 2002). Por su participación en complejos de adhesión la falta de función de ZO-1 es incompatible con la viabilidad y no se ha podido abordar el estudio de su requerimiento durante el desarrollo de los podocitos. Dada su expresión en los nefrocitos y la interacción descrita para su ortólogo en vertebrados, pensamos que Pyd era un buen candidato a formar parte del complejo protéico del diafragma de filtración en *Drosophila*, actuando “downstream” de Duf. Así, Pyd podría estar mediando la transmisión de la señal desde la membrana a parte ó la totalidad de los efectores finales de la vía, que en vertebrados se ha implicado en procesos de reorganización de citoesqueleto, supervivencia y endocitosis (revisado en Benzing, 2004). Para resolver el papel de Pyd (y por extensión de su ortólogo, ZO-1) dentro de la ruta de señalización, decidimos

analizar su función en los nefrocitos de *Drosophila*.

El gen *pyd* mapea en la región 85B del cromosoma 3R y da lugar a 8 transcritos por splicing alternativo, tres de los cuales RA, RB y RE están representados en la figura 31A. Pyd pertenece a la familia de proteínas MAGUK, que se caracteriza por la presencia de dominios PDZ, SH3 y GuK (dominio guanilato kinasa-like, ya que carece de actividad catalítica). Todos los transcritos de *pyd* codifican para proteínas que contienen los dominios conservados (3 dominios PDZ, 1 dominio SH3 y 1 dominio GuK) y tienen homología estructural con la proteína ZO-1 (Figura 31B). En este trabajo hemos usado el clon EST (Expressed Sequence Tag) LD43161, que codifica el polipéptido Pyd-E.

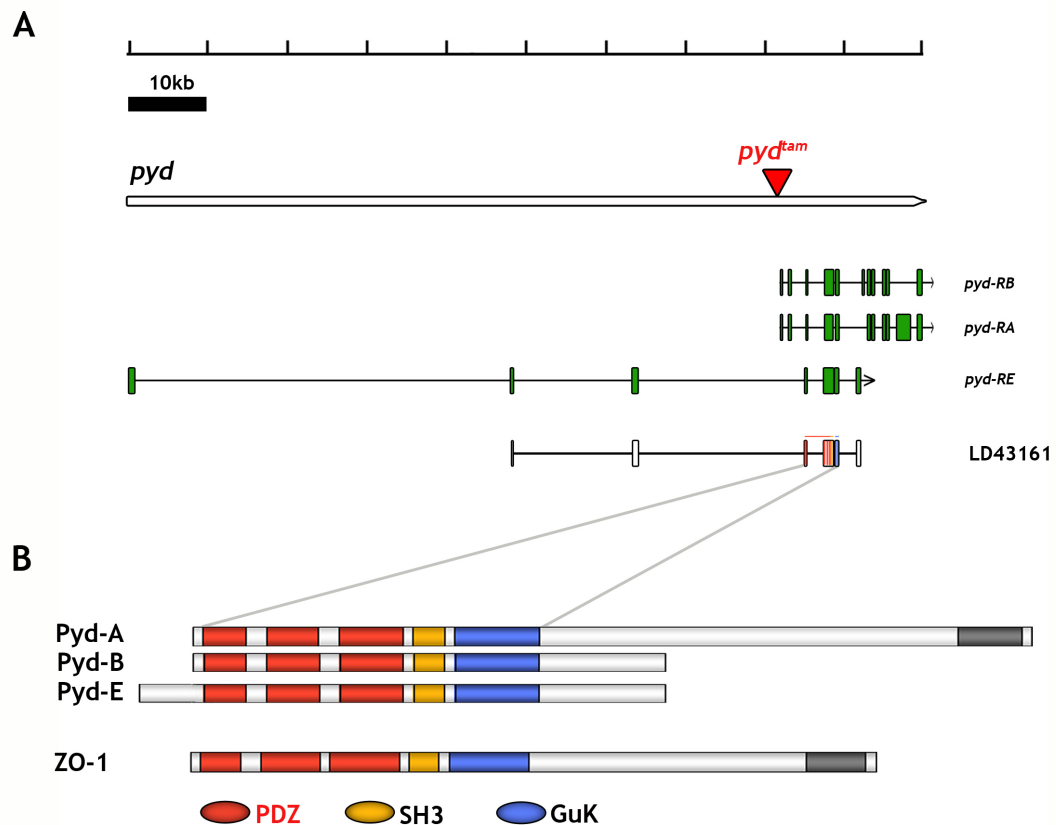


Figura 31.- Mapa molecular de la región genómica de *pyd* y proteínas a las que da lugar. (A) ADN genómico de *pyd* en el que la flecha señala el sentido de transcripción. Están representados algunos de los transcritos, *pyd-RA*, *pyd-RB* y *pyd-RE* (las cajas verdes corresponden a los exones del ADNc de *pyd*) y el EST usado LD43161 (cajas blancas, dentro de las cuales se señalan con diferentes colores las regiones que dan lugar a los diferentes dominios de la proteína). Las proteínas que se traducen tienen en común la región de dominios PDZ, SH3 y GuK y se diferencian en la extensión de la región 3' y 5'. La proteína ZO-1 de humanos se encuentra representada en la parte inferior de la figura. El triángulo invertido de color rojo señala el lugar donde está inserto el elemento P del alelo *pyd^{tam}*, justo delante de los primeros exones codificantes de los transcritos *pyd-RA* y *pyd-RB* y en un intrón de *pyd-RE*.

2.1. Asociación de Polychaetoid y Dumbfounded en nefrocitos

En primer lugar quisimos averiguar si Duf y Pyd interaccionan en *Drosophila*. Para ello realizamos análisis de coimmunoprecipitación en células Schneider-2 (S2) de *Drosophila* cotransfectadas con Duf y Pyd. El ADNc de *pyd* se clonó en el vector pAc5.1/V5-HIS eliminando el STOP codon para que el epítipo V5 del vector entrara en fase en el extremo carboxi-terminal de Pyd (Pyd-V5). Por otro lado los ADNc de *duf* y ADNc de *duf-GFP*, en el que la proteína fluorescente GFP se ha introducido antes del dominio carboxi-terminal de unión a PDZ de Duf (clonajes en material y métodos), se clonaron en el vector pMK33/pMtHy. Cuando transfectamos células S2 con Pyd-V5 y revelamos con un anticuerpo contra el epítipo

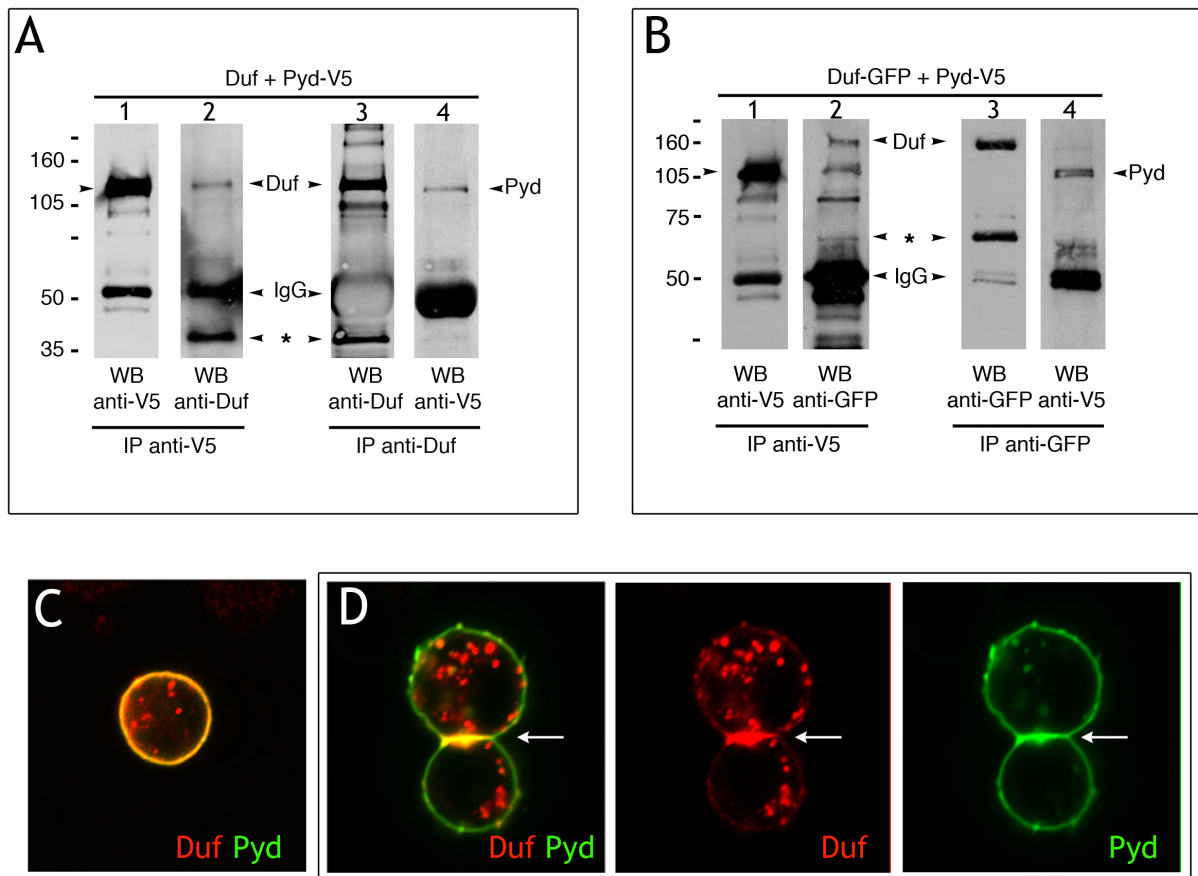


Figura 32.- Coimmunoprecipitación de Duf y Pyd en células Schneider (S2). (A) Blot representativo de la coimmunoprecipitación de Duf y Pyd-V5 inmunoprecipitando (IP) con anti-V5 y revelando con anti-Duf_{int} (carril 2) e inmunoprecipitando con anti-Duf_{int} y revelando con anti-V5 (carril 4). Los carriles 1 y 3 sirven de control de carga. En el carril 2 se observan dos bandas, correspondientes a Duf que coimmunoprecipitan con Pyd (cabezas de flecha). La de mayor peso molecular corresponde a la proteína Duf completa y la de menor tamaño a una proteína equivalente a la región intracelular más el dominio transmembrana (asterisco). (B) Blot representativo de la coimmunoprecipitación de Duf-GFP y Pyd-V5, mostrando de nuevo que Pyd coimmunoprecipita con la proteína Duf completa y con un fragmento que corresponde a las regiones intracelular más transmembrana. En todos los casos vemos una banda de 50 kD correspondiente a las IgG. (C) Imágenes de microscopía confocal de células S2 cotransfectadas con Duf y Pyd. La proteína Pyd-V5 en células S2 se localiza en la membrana (imagen no mostrada). Cuando co-transfectamos con *pyd-V5* y Duf células S2 y estas se encuentran aisladas ambas proteínas se distribuyen uniformemente en la membrana. Cuando las células se agrupan Duf se restringe en su mayoría a la zona de contacto celular y Pyd se acumula donde se localiza Duf, aunque sigue observándose también en el resto de la membrana.

V5, observamos su localización en membrana plasmática. Esta sublocalización podría ser debida la presencia de dominios SH3 y PDZ que pueden mediar interacciones con proteínas de membrana, ya que Pyd no tiene dominios transmembrana. Cuando transfectamos las células con Duf ó con Duf-GFP y teñimos con anti-Duf_{int} ó anti-GFP, la localización de Duf en la membrana depende del grado de agregación celular. Así, observamos que cuando las células estaban aisladas la proteína se distribuía de forma homogénea en la membrana. Cuando las células agregaban Duf se concentraba en las regiones de membrana de contacto celular, como ya había sido descrito en estudios previos (Galletta et al., 2004; Menon et al., 2005). Cuando cotransfectamos las células con Duf ó Duf-GFP y Pyd-V5 y nos fijamos en células aisladas tanto Duf como Pyd colocalizaban en la membrana plasmática de las células (Figura 32C). Si nos fijábamos en células asociadas en las que Duf se acumulaba en sitios de contacto celular, aunque Pyd seguía estando en toda la membrana, tendía a acumularse con Duf (Figura 32D). Estos datos indicaban que Duf y Pyd podrían estar interaccionando. Realizamos estudios de coimmunoprecipitación de Pyd-V5 tanto con Duf (Figura 32A), como con Duf-GFP (Figura 32B) y comprobamos que Duf/Duf-GFP coimmunoprecipita con Pyd y viceversa en células S2 (para detalles ver materiales y métodos), revelando la asociación de ambas proteínas.

2.2. Análisis fenotípico del alelo *pyd^{lam}* en los nefrocitos en guirnalda

Para realizar el análisis de la falta de función de *pyd* en nefrocitos lo primero era conseguir alelos mutantes adecuados. En *Drosophila* se ha descrito la participación de Polychaetoid en varios procesos del desarrollo como son: la especificación de precursores neurales, la formación del patrón de omatidios del ojo, el cierre dorsal embrionario y el desarrollo de las traqueas (Chen et al., 1996; Takahisa et al., 1996; Takahashi et al., 1998; Wei and Ellis, 2001; Seppa et al., 2008). En estos estudios se han utilizado distintos alelos de *pyd*, todos ellos mutantes hipomorfos, ya que no se dispone de ningún alelo nulo. El alelo *pyd^{lam}* se identificó por su fenotipo de producción de órganos sensoriales extranumerarios en el notum de *Drosophila* (Takahisa et al., 1996), molecularmente corresponde a una inserción de un elemento P justo antes del extremo 5' del primer exón no codificante de los transcritos *pyd-RB* y *pyd-RA* y en el tercer intrón del transcrito *pyd-RE* (figura 31A). Por la localización de la inserción del elemento P quisimos analizar si se afectaba la expresión de *pyd* en los nefrocitos. Para ello, hicimos hibridaciones *in situ* con una sonda de ARN de *pyd* en el tipo silvestre y en *pyd^{lam}* y comprobamos que *pyd* se expresa en los nefrocitos del tipo silvestre al menos desde el estadio 13 embrionario hasta tercer estadio larvario (Figuras 33B, G). Asimismo en *pyd^{lam}*, observamos una disminución muy notoria de la expresión de *pyd* en la mayoría de los tejidos embrionarios (Figura 33D-F, comparar con Figura 33A-C) y ausencia completa en los nefrocitos durante embriogénesis y desarrollo larvario (Figura 33F y H). Por lo que confirmamos que si bien el alelo *pyd^{lam}* es un alelo hipomorfo para la mayoría de los tejidos embrionarios, se comporta como nulo en lo que se refiere a los nefrocitos. Por ello, decidimos usar el alelo *pyd^{lam}* para estudiar el requerimiento de Pyd en nefrocitos a lo largo de todo el desarrollo, ya que además contamos con la ventaja de que podemos obtener

individuos viables homocigóticos. Al diseccionar los nefrocitos del alelo *pyd^{lam}* vimos que su morfología era aberrante y que los nefrocitos estaban aglutinados (Figura 33H, comparar con 33G). Para asegurarnos de que el fenotipo observado era debido a la falta de función de

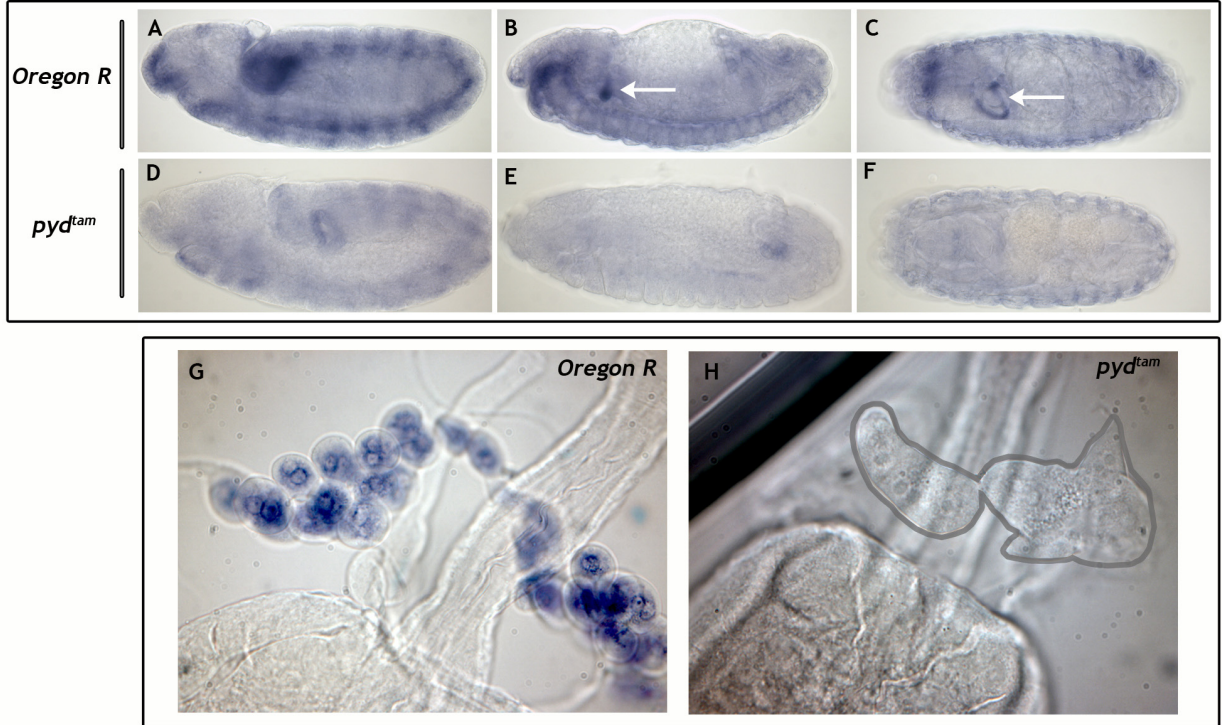


Figura 33.- Hibridación in situ de *pyd* en mutantes *pyd^{lam}*. (A-F) Hibridación in situ de *pyd* en embriones silvestres de estadios 11, 14 y 16 (A-C) y en mutantes *pyd^{lam}* en los mismos estadios en los que se observa una disminución muy fuerte de los niveles de expresión de *pyd* en todos los derivados y su ausencia en nefrocitos (D-F). Las flechas en B-C señalan a los nefrocitos. (G, H) Expresión de *pyd* en tercer estadio larvario de individuos silvestres y en el alelo *pyd^{lam}*. En este estadio *pyd* no se expresa en absoluto en los nefrocitos.

pyd en los nefrocitos, quisimos descartar la posibilidad de que el cromosoma *pyd^{lam}* tuviera otras mutaciones asociadas. Para ello combinamos el alelo *pyd^{lam}* con las deficiencias del cromosoma 3R que incluyen *pyd*: *Df(3R)BSC478* y *Df(3R)BSC506* y comprobamos que el fenotipo observado en los nefrocitos se debía a la falta de función de *pyd*.

2.2.1. Análisis ultraestructural de nefrocitos en guirnalda en el alelo *pyd^{lam}*

El análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica de transmisión de los nefrocitos en guirnalda de tercer estadio larvario en mutantes *pyd^{lam}* reveló la ausencia de canales de laberintina y diafragmas de filtración (Figuras 34A y A'). Ocasionalmente se observan pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática limitadas por condensaciones de material denso a los electrones (flecha en Figura 34A). En las regiones de membrana expuestas

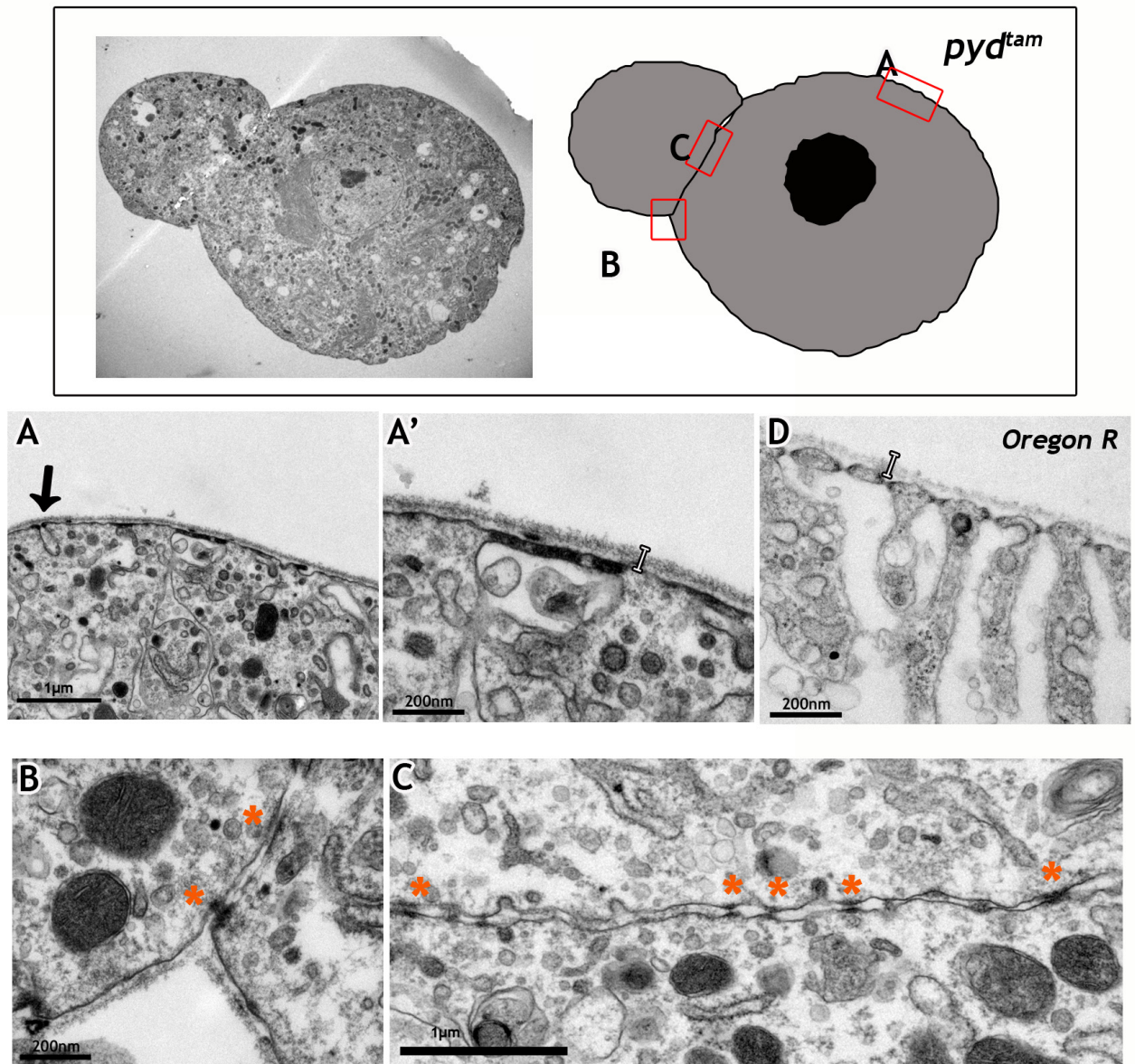


Figura 34.- Análisis ultraestructural de los nefrocitos en guirnalda en mutantes *pyd^{tam}*. En el recuadro superior se muestra una micrografía de transmisión de dos nefrocitos mutantes *pyd^{tam}* apuestos y el correspondiente esquema en el que se indican con recuadros rojos las regiones que están ampliadas en las imágenes inferiores. (A, A') Detalles de la superficie de los nefrocitos mayoritariamente libre de diafragmas de filtración, aunque muy ocasionalmente queda alguna unión de este tipo (punta de flecha negra). La membrana basal está más engrosada que el caso silvestre (ver barra de tamaño blanca). (B y C) Detalles de las zonas de aposición celular, observar la abundancia de zonas de material denso a los electrones en las membranas celulares (asteriscos naranjas).

a la hemolinfa se observan multitud de placas de material denso a los electrones (Figura 34A y detalle en 34A'), nunca presentes en el tipo silvestre (Figura 34D) y un engrosamiento de la membrana basal menor al observado en mutantes *duf* (Figura 34A', comparar con Figuras 34D y 24C). Además observamos que los nefrocitos en lugar de estar aislados, mantienen muchas regiones de contacto celular, de ahí su apariencia aglutinada al diseccionarlas. En las zonas de contacto celular detectamos la presencia de uniones adherentes similares en apariencia a las que están presentes en estadios tempranos del desarrollo (asteriscos naranjas en la Figura 34B y C, comparar con Figura 21). Los análisis de microscopía electrónica de barrido corroboran estos resultados, ya que la superficie de los nefrocitos en el mutante *pyd^{dam}* sólo presenta rugosidades ocasionales (Figura 35). Estos resultados son muy relevantes, ya que es el primer abordaje fenotípico al estudio del requerimiento funcional de los adaptadores Pyd/ZO-1 del complejo multiproteico del diafragma de filtración. Además la caracterización de la función de Pyd podría permitirnos identificar puntos de bifurcación en la vía de señalización de Duf/Sns.

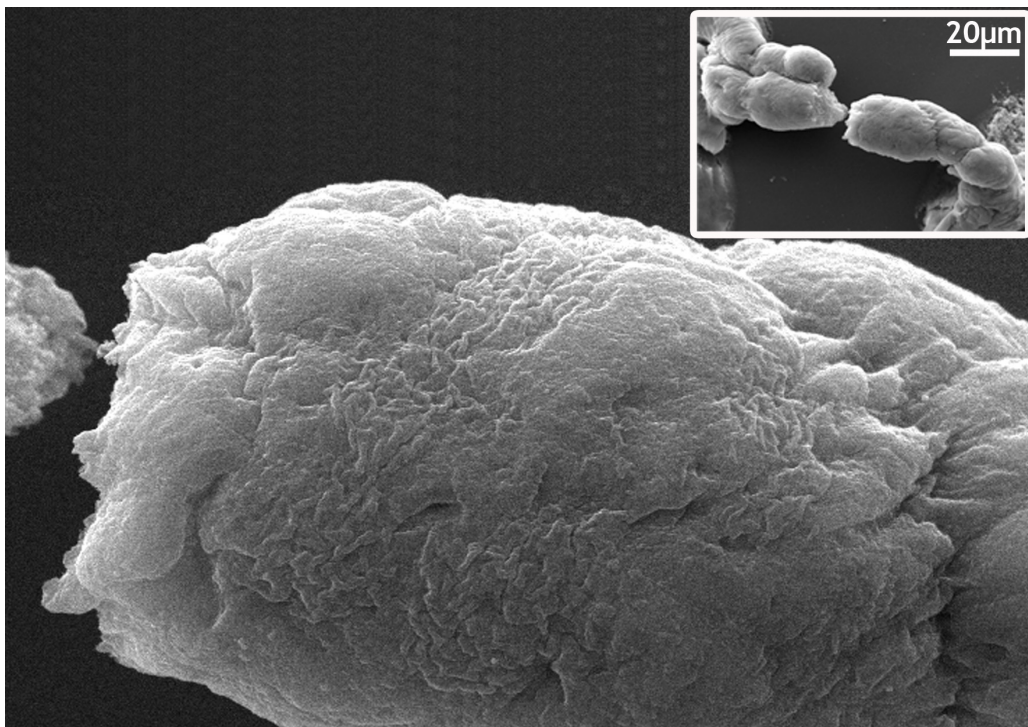


Figura 35.- Análisis de la superficie celular de nefrocitos *pyd^{dam}* por microscopía electrónica de barrido. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de nefrocitos de tercer estadio larvario del mutante *pyd^{dam}* a diferentes aumentos. La superficie observada en detalle revela la apariencia lisa de las células en comparación con el tipo silvestre (Figura 26B, D). En el marco superior se muestra a menor aumento el grupo de nefrocitos seleccionados, observar el mayor aglutinamiento de los mismos (Figura 26B, D para comparación con el tipo silvestre),

2.2.2. Localización de Duf y Sns en nefrocitos *pyd^{lam}*

La ausencia de diafragmas de filtración en los nefrocitos mutantes *pyd^{lam}* y la capacidad de asociación entre Duf y Pyd que hemos demostrado, nos sugería que Pyd podría ser necesario para estabilizar a Duf y posiblemente a Sns, dada su interacción heterotípica con Duf, en la membrana. Por ello, analizamos la localización de Duf y Sns en nefrocitos *pyd^{lam}* de tercer estadio larvario. Lo primero que observamos fue que la expresión de Duf y Sns estaba muy disminuida. Lo que queda de Duf y Sns se localiza en la membrana ó bien en regiones de contacto celular ó en zonas aisladas de la membrana expuesta. En cualquier caso, Duf y Sns siempre colocalizan en estas regiones (puntas de flecha en la Figura 36). Esta localización de Duf y Sns en los nefrocitos *pyd^{lam}* de tercer estadio es similar a la de estadios embrionarios tempranos en el tipo silvestre, cuando ambas proteínas se acumulan en las zonas de contacto celular (Figura 15B-C'). Estos datos sugieren que Pyd es necesario para la transición de uniones adherentes a diafragmas de filtración.

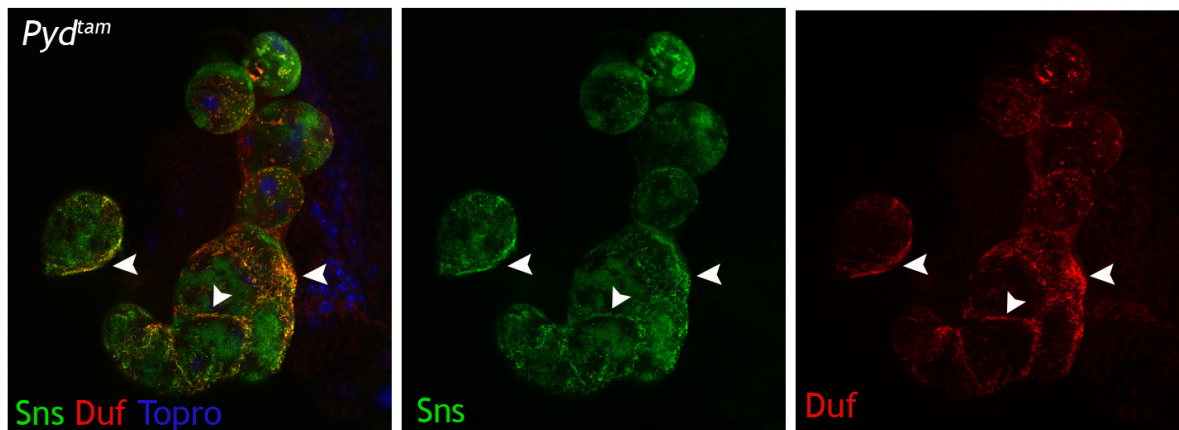


Figura 36.- Localización de Duf y Sns en nefrocitos de mutantes *pyd^{lam}*. Imágenes de microscopía confocal de nefrocitos de tercer estadio larvario en el mutante *pyd^{lam}*. Duf está revelada con el anticuerpo anti-Duf_{ext} (rojo) y Sns en verde. Duf y Sns apenas se detectan en este fondo mutante, donde podemos observar como la señal parece restringida a las zonas de contacto celular, donde ambas proteínas colocalizan (puntas de flechas).

3. REQUERIMIENTO DE DUMBFOUNDED EN MIOGÉNESIS

Se ha descrito que la falta de función de *rst* y *duf* en la deficiencia *Df(1)w^{67k30}* produce un bloqueo total de la fusión de mioblastos (Ruiz-Gómez et al., 2000) y que en mutantes *rst* los defectos de fusión son minoritarios (Strunkelnberg et al., 2001). Hasta ahora no existían alelos de falta de función que afectasen sólo a *duf*, aunque en el trabajo de Strunkelnberg y cols del 2001 utilizan como alelos nulos de *duf* las combinaciones *Df(1)N⁵⁴¹⁹/Df(1)w^{67k30}* y *Df(1)N⁵⁴¹⁹/Y; cosP479BE/+*, en la que se rescata la función de *N* con un cósmido que porta el DNA genómico del gen, y dicen no observar ningún defecto muscular obvio. Aún así y dado el fenotipo débil de *rst* en fusión quisimos analizar la contribución de *duf* en este proceso

haciendo uso de los alelos que hemos generado *Df(1)duf^{sp1}* y *Df(1)duf^{pmf}*.

En los embriones hemizigóticos *Df(1)duf^{sp1}* teñidos con anti-Tropomiosina, observamos defectos en la morfología de los músculos, que consistentemente son más delgados y se encuentran rodeados de mioblastos sin fusionar (Figura 37B', B'') y en la formación de la primera constricción del intestino, que no tiene lugar (Figura 37B). Todas estas alteraciones son consistentes con defectos en fusión (Carrasco-Rando, 2008). Asimismo, en los embriones *Df(1)duf^{pmf}* observamos algunos mioblastos sin fusionar en la región dorsal (Figura 37C'') donde hemos descrito que la expresión de *duf* está disminuida (Figura 18D).

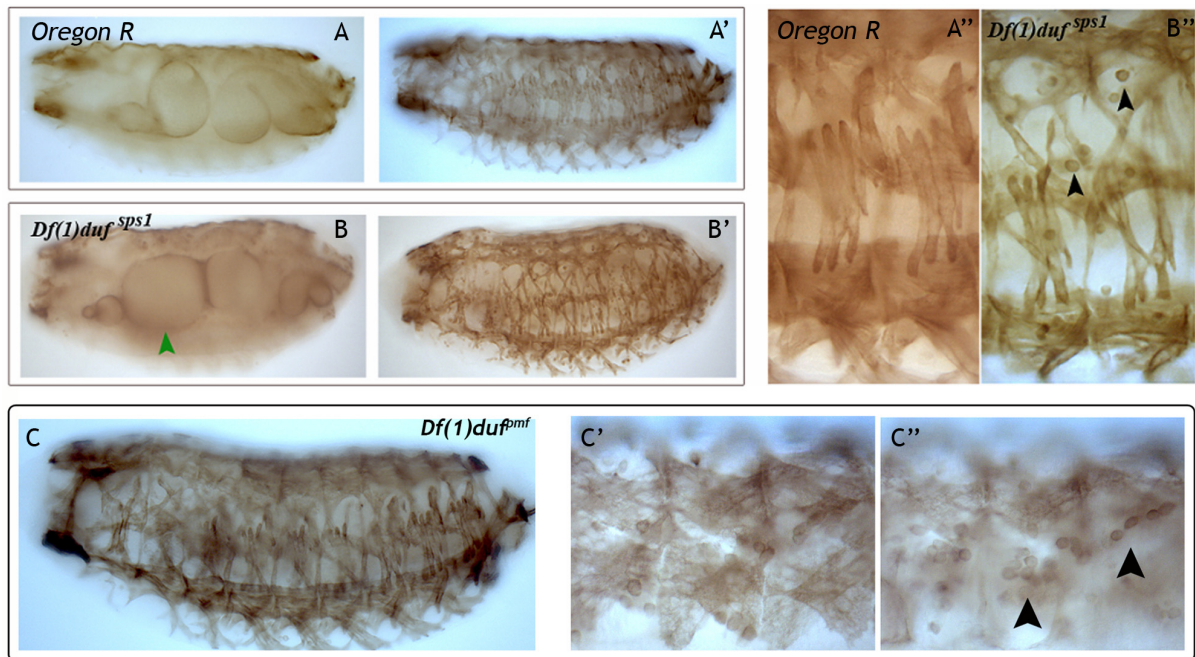
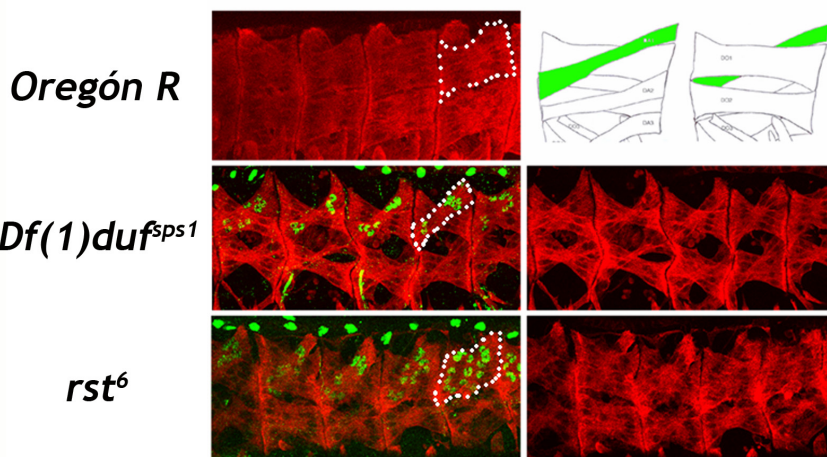


Figura 37.- Fenotipo muscular de las deficiencias *Df(1)duf^{sp1}* y *Df(1)duf^{pmf}*. (A-C'') Imágenes de embriones del tipo silvestre (A-A''), *Df(1)duf^{sp1}* (B-B'') y *Df(1)duf^{pmf}* (C-C'') teñidos con anti-Tm. En los embriones *Df(1)duf^{sp1}* la falta de fusión se refleja en la presencia de músculos más delgados (B', B''), mioblastos sin fusionar (punta de flecha negra en B'') y falta de la primera constricción del intestino (punta de flecha verde en B). En C'-C'' se muestran ampliaciones de la región dorsal de embriones *Df(1)duf^{pmf}* en diferentes planos focales. Observar la presencia de mioblastos sin fusionar (puntas de flecha negra en C''), lo que refleja un defecto en fusión.

Para cuantificar el fenotipo de falta de fusión en estas deficiencias contamos el número de núcleos presentes en el músculo dorsal DA1 en el estadio 16, usando como marcador nuclear el factor de transcripción *even-skipped* (*eve*), de expresión restringida a este músculo (Frasch y cols., 1987; Carrasco-Rando, 2008). En la figura 38 se muestra el resultado de dicha cuantificación realizada en segmentos abdominales A2-A6 de embriones mutantes *duf*, *rst* y en individuos silvestres. Así, el promedio de núcleos en DA1 en el tipo silvestre es de 14 y en los mutantes *rst*⁶, *Df(1)duf^{pmf}* y *Df(1)duf^{sp1}* es de 10, 9 y 6, respectivamente, lo que corresponde a una reducción del 28, 36 y 57% en el número de núcleos. Por lo que concluimos que, al contrario de lo que se había descrito en el trabajo de Strükelberg, *duf* es necesario

para el proceso de fusión y su contribución es mayor que la de *rst*, como se esperaría por los patrones de expresión de ambos genes en el mesodermo (Ramos y cols, 1993; Ruiz-Gómez y cols, 2000). Es importante destacar que en la *Df(1)duf^{pmf}*, sólo se observan mioblastos sin fusionar en la región dorsal, que como hemos dicho es en la que desaparece ó disminuye la expresión de *duf*, así, la diferencia en el número de núcleos entre *Df(1)duf^{pmf}* y *Df(1)duf^{sp1}* podría deberse a la expresión residual de *duf*.

A



B

	<i>silvestre</i>	<i>Df(1)duf^{sp1}</i>	<i>Df(1)duf^{pmf}</i>	<i>rst⁶</i>
Nºnúcleos DA1	14,4 ± 1,4	6,2 ± 1,3	9 ± 1,6	10,5 ± 1,9

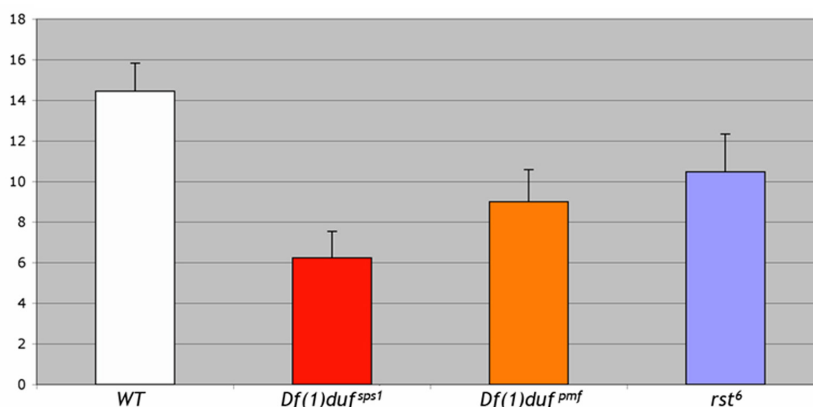


Figura 38.- Cuantificación del fenotipo de fusión de *duf* y *rst* en el músculo DA1. (A) Imágenes de la región dorsal de embriones en estadio 16 de tipo silvestre, teñidos con anti-Tm (rojo) y *Df(1)duf^{sp1}* y *rst⁶* teñidos con anti-Eve (verde) y anti-Tm (rojo). El músculo DA1 está resaltado por una línea discontinua en los segmentos A6 y marcado en verde en el esquema que representa el patrón muscular silvestre. Podemos apreciar como el número de núcleos y el grosor del músculo DA1 es mayor en mutantes *rst* que en mutantes *duf* y que el músculo DA1 en *rst* es un poco menor que en el tipo silvestre. (B) Gráfica del conteo nuclear en DA1 de embriones silvestres y mutantes para *duf* y *rst*. En ordenadas se representa el número de núcleos eve-positivos y en abscisas los distintos genotipos cuantificados. En cada caso se cuantificaron 20 hemisegmentos abdominales.

7

DISCUSIÓN

Las proteínas de *Drosophila* de la superfamilia de las inmunoglobulinas pertenecientes al grupo IRM (Irre Cell Recognition Module), entre las que se encuentran Dumbfounded (Duf) y Sticks and stones (Sns), están implicadas en el reconocimiento heterotípico entre células diferentes (Fischbach y cols., 2009). Así, en el sistema muscular median el reconocimiento y la adhesión entre dos poblaciones distintas de mioblastos, los mioblastos fundadores (MF) y los mioblastos competentes en fusión (MCF), que se fusionan posteriormente formando músculos multinucleados (Ruiz-Gómez y cols., 2000; Bour y cols., 2000; Strunkelnberg y cols., 2001; Kocherlakota y cols., 2008). Este reconocimiento heterotípico es también la base del proceso de reordenamiento de los distintos tipos celulares del ojo de la mosca durante el desarrollo pupal, aunque en este caso las proteínas IRM implicadas son Roughest (Rst) y Hibris (Hbs) (Ramos y cols, 1993; Reiter y cols, 1996; Bao y Cagan 2005). Además, se sabe que esta función está conservada en otras especies. Así los ortólogos de Duf y Sns en *Caenorhabditis elegans*, SYG-1 y SYG-2 respectivamente, también median reconocimiento heterotípico entre dos poblaciones celulares distintas, la motoneurona HSNL y las células epiteliales de la vulva que hacen de guía neuronal, determinando la especificidad de la sinapsis (Chao y Shen, 2008; Shen y Bargmann, 2003; Shen y cols., 2004). La base de esta función de reconocimiento celular está en la distribución asimétrica de las proteínas IRM en la membrana de células próximas, causando su aposición gracias a las propiedades de interacción heterotípica de las proteínas IRM.

En este trabajo hemos establecido que Duf y Sns además se expresan en otro derivado mesodérmico, los nefrocitos de *Drosophila*, donde llamativamente ambas proteínas se encuentran

presentes en la membrana de la misma célula. Esto nos llevó a estudiar el papel funcional que poseen Duf y Sns en los nefrocitos en guirnalda, ya que el único tipo celular descrito en el que se coexpresan los ortólogos de ambos tipos de proteínas, NEPH1 y nephrin respectivamente, es en los podocitos del riñón de vertebrados. Así, nos planteamos la posibilidad de que el papel funcional que desempeñan Duf y Sns en los nefrocitos de *Drosophila*, cuya función consiste en la eliminación de sustancias tóxicas de la hemolinfa, podría estar relacionado con el que cumplen NEPH1 y nephrin en los podocitos renales.

En este trabajo mostramos la homología existente entre ambos sistemas excretores tanto a nivel molecular, como ultraestructural y funcional. Hemos comprobado que en los nefrocitos en guirnalda ambas proteínas IRM, Duf y Sns, al igual que sus ortólogos en vertebrados, están implicadas en la formación de un tipo de unión especializada dentro de las células denominada diafragma de filtración. Además hemos demostrado que mutaciones en Duf y Sns afectan a la capacidad endocítica de los nefrocitos en guirnalda, resultando en un fenotipo equivalente a la alteración de la capacidad filtradora de los podocitos, causante de proteinurias masivas, en ausencia de nephrin y NEPH1. Finalmente, hemos establecido que *Drosophila* es un modelo experimental idóneo para estudiar las incógnitas que aun existen sobre el desarrollo, mantenimiento, reparación y funcionalidad del diafragma de filtración de los podocitos del sistema excretor de vertebrados

1. Las proteínas IRM median distintas funciones dependiendo del contexto celular

Hasta la fecha se han identificado en *Drosophila* cuatro proteínas pertenecientes a las proteínas IRM (Fischbach y cols., 2009). Duf y su parólogo Rst, pertenecen al subgrupo denominado Duf/Neph-like, con un dominio extracelular que consta de cinco dominios de inmunoglobulina. Por otro lado, Sns y su parólogo Hbs pertenecen al subgrupo Sns/Nephrin-like cuya región extracelular consta de 8 dominios de inmunoglobulina y uno fibronectina de tipo III. El reconocimiento heterotípico entre diferentes poblaciones celulares está mediado por los dominios de inmunoglobulina de las regiones extracelulares de las proteínas IRM, que dentro de cada subgrupo son los que presentan más homología. Así, Duf y Rst presentan en la región extracelular un 63% de homología frente al 15% de la región intracelular (Strunkelnberg y cols., 2003). Sns y Hbs también poseen una mayor homología entre sus regiones extracelulares, un 69% frente a un 48% de homología total. Las regiones intracelulares son más divergentes de forma que la de Sns consta de 376aa frente a los 166aa de Hbs (Artero y cols., 2001). Las proteínas IRM pueden interaccionar entre ellas vía reconocimiento homotípico o heterotípico. De esta forma se ha visto que en células en cultivo S2 de *Drosophila*, sólo las regiones extracelulares de Duf y Rst pero no las de Sns son capaces de llevar a cabo interacciones homotípicas en trans (Dworak y cols., 2001; Galletta y cols., 2004), aunque Sns interacciona homotípicamente en cis (Shelton y cols., 2009). Por el contrario, se han identificado interacciones heterotípicas entre Duf y Sns con las otras tres proteínas IRM (Dworak y cols., 2001; Galletta y cols., 2004; Shelton y cols., 2009). Esta promiscuidad en las interacciones homo y heterotípicas entre las proteínas IRM podría facilitar su oligomerización en cis o en trans y su participación en la

formación de complejos multiprotéicos muy distintos, que podrían mediar distintas respuestas intracelulares y/o modular el grado de señalización de estos complejos.

La homología estructural que existe entre Duf y Rst y entre Sns y Hbs unido a que poseen patrones de expresión parecidos en diferentes tejidos a lo largo del desarrollo, sugiere que puedan tener cierta redundancia funcional. Nuestros datos y los de otros grupos indican que ésta redundancia depende del contexto celular donde se encuentran las proteínas, como en el desarrollo muscular ó durante la formación del ojo y los nefrocitos de *Drosophila*.

Durante el desarrollo muscular Sns y Hbs tienen un patrón de expresión semejante, restringiéndose a los mioblastos competentes en fusión durante el tiempo en el cual el proceso de fusión está teniendo lugar. Sin embargo a nivel funcional el requerimiento de ambas proteínas es diferente, puesto que la fusión de mioblastos sólo se afecta en mutantes *sns* (Artero y cols., 2001; Dworak y cols., 2001). Recientemente se ha comprobado que la expresión de una proteína quimérica constituida por la región extracelular de Hbs y la intracelular de Sns, sí puede rescatar el fenotipo de falta de fusión observado en mutantes *sns^{XB3}*, al contrario que la proteína Hbs completa (Kocherlakota y cols., 2008). Por tanto se puede concluir que la parte intracelular de Sns, que es muy diferente de la de Hbs, es la que es eficiente y necesaria para señalar durante el proceso de fusión, mientras que las regiones extracelulares, más homólogas, podrían tener una función de reconocimiento celular redundante. En el caso concreto de Duf y Rst, se ha descrito que ambas poseen una redundancia funcional durante el reconocimiento, atracción y adhesión de MF y MCF. Así, en la deficiencia de ambos genes (*Df(1)w^{67k30}*) se observa una falta de reconocimiento entre los mioblastos, que conlleva a una ausencia total de fusión (Ruiz-Gómez y cols., 2000; Strunkelnberg y cols., 2001), mientras que en los alelos nulos *rst*, aunque presentan defectos musculares, la formación de músculos multinucleados tiene lugar y por lo tanto los mioblastos son capaces de atraerse. Del mismo modo, una combinación génica que delecionaría *duf* sin eliminar *rst* se ha descrito que carece de fenotipo de fusión (Strunkelnberg y cols., 2001).

A la vista de estos datos, y puesto que en este trabajo hemos generado deficiencias que eliminan *duf* sin alterar la expresión de *rst*, nos planteamos el estudio de la contribución funcional en el proceso de fusión de las proteínas Duf y Rst. Nuestros resultados muestran que a pesar de que ambas tienen un papel redundante durante la formación del músculo multinucleado, la contribución de cada una de ellas es diferente. De este modo, observamos que en ausencia de Duf tienen lugar menor número de fusiones que en ausencia de Rst, por lo que podemos concluir que Duf está contribuyendo de un modo más eficaz al proceso de fusión. Esta mayor eficiencia puede ser debida bien a que Duf y Rst tienen un patrón de expresión parecido pero no idéntico (siendo Duf específica de MF, mientras que Rst se expresa en ambas poblaciones, MF y MCF), ó bien a que Duf sea más eficaz en los procesos de reconocimiento y/o señalización necesarios para que tenga lugar el proceso de fusión. Nuestros datos obtenidos en el rescate del fenotipo de falta de fusión de la deficiencia *Df(1)w^{67k30}*, mediante la expresión de una copia de *rst* ó de *duf* dirigida bajo el control del mismo promotor-GAL4, muestran mayor eficacia de Duf en el rescate (datos no mostrados). Incluso los datos de sobreexpresión son diferentes

para cada uno de ellas, de manera que mientras la sobreexpresión de Duf no produce ningún fenotipo en la formación del músculo, la sobreexpresión de Rst da un claro fenotipo de falta de fusión (Strunkelnberg y cols., 2001 y nuestros datos). Este efecto podría deberse como en el caso de Sns y Hbs a diferencias en capacidad de señalización de los dominios intracelulares de ambas proteínas. A falta de analizar el efecto de proteínas quiméricas, los resultados de sobreexpresión parecen sugerir que este es el caso.

Por otro lado, Rst y Hbs son las proteínas IRM determinantes durante el desarrollo del ojo compuesto de la mosca. En la pupa temprana cada omatidio está compuesto de 8 células fotorreceptoras, 4 células cono y 2 células pigmentarias primarias. En ese estadio los distintos omatidios están separados por un grupo de células indiferenciadas, las células precursoras interomatidiales (IPCs), que en la última fase del desarrollo del ojo van a formar un entramado de células pigmentarias cuya función es organizar y aislar ópticamente los distintos omatidios. Este proceso de formación de patrón implica cambios muy precisos de forma celular, reordenamientos celulares y muerte programada. Tanto Rst como Hbs median reconocimiento heterotípico en este proceso de reordenamiento celular y se ha propuesto que la adhesión preferencial mediada por estas proteínas puede crear un patrón preciso de células pigmentarias. Así, se ha descrito que los mutantes *rst* y *hbs* tienen fenotipo de ojo rugoso, debido a fallos en el reordenamiento de los distintos tipos celulares y en la apoptosis necesaria para eliminar las células en exceso (Araujo y cols., 2003; Bao y Cagan, 2005; Reiter y cols., 1996). Mediante el uso de las herramientas generadas en este trabajo hemos querido analizar la contribución de Duf y Sns al desarrollo del ojo. Nuestros datos indican que aunque las 4 proteínas IRM se expresan en el ojo, al menos Duf no parece tener una función en el proceso de reordenamiento celular de las células pigmentarias. Así, no hemos observado ningún fenotipo evidente en el ojo en las deficiencias de *duf*, aunque si conseguimos generar ojos rugosos por atenuación de *sns* mediante el uso de RNA interferente. Por el contrario la sobreexpresión de Duf durante el desarrollo del ojo produce fenotipos de ojo rugoso similares a los de falta de función de *rst*. Estos datos sugieren que cuando se expresa en exceso Duf puede competir con Rst. Aunque desconocemos la base del fenotipo de sobreexpresión de Duf en el ojo, la mayor divergencia en la región intracelular entre Duf y Rst sugiere que dicho fenotipo se debe a diferencias en la capacidad de señalización intracelular de ambas proteínas. El uso de moléculas quiméricas nos permitirá resolver este interrogante.

2. Las proteínas IRM en nefrocitos no median el reconocimiento entre poblaciones celulares distintas

En el mesodermo, sistema nervioso y durante el desarrollo del ojo, las proteínas IRM pertenecientes a los dos subgrupos, tienen un patrón de expresión complementario y están implicadas en procesos de reconocimiento celular. En este trabajo hemos descrito también el patrón de expresión de las proteínas IRM durante el desarrollo de los nefrocitos en guirnalda. Hemos establecido que mientras Duf y Sns coexpresan en dicho tejido a lo largo de todo el desarrollo embrionario y larvario, Rst y Hbs tan solo lo hacen en larvas de tercer estadio.

Estos resultados implican que independientemente de la capacidad de asociación homotípica y heterotípica previamente descritas para Duf y Sns, en estas células existe la posibilidad de crear complejos multiprotéicos dentro de la misma célula que incluyan proteínas IRM pertenecientes a ambos subgrupos y que éstos podrían mediar rutas de señalización intracelulares distintas a las que operan durante miogénesis.

Una característica específica de los nefrocitos en guirnalda es que se trata de células binucleadas. Debido a esta peculiaridad, nos preguntamos si Duf y Sns, a pesar de que se coexpresan en la misma célula, podían estar implicadas en un proceso de fusión en este tipo celular. En este caso la función señalizadora se conservaría aún cuando existiera la posibilidad de formar complejos multiprotéicos que contuvieran Duf y Sns, situación que no se da en los músculos. Sin embargo, nuestros datos indican que este no es el caso, ya que mutantes *sns*⁻ y *rst duf* en los que se generan músculos mononucleados, los nefrocitos en guirnalda siguen siendo binucleados. Lo mismo es cierto en otros mutantes de falta de función de genes esenciales para el proceso de fusión muscular, como son *mbc*⁻, *titin*⁻ y *rols*⁻. Además, hemos podido comprobar que estos genes no se expresan en los nefrocitos. Por otra parte, hemos observado que en mutantes para un gen de ciclo celular, *ciclinaA*, los nefrocitos en guirnalda son mononucleados mientras los músculos son sincitiales. A la vista de estos resultados y a falta de analizar el fenotipo de embriones mutantes en la línea germinal, sugerimos que la naturaleza binucleada de los nefrocitos se debe a un proceso de división sin citoquinesis y no a fusión celular. Por tanto, en los nefrocitos, Duf y Sns no parecen mediar reconocimiento y adhesión entre células distintas y su función no está relacionada con la fusión.

3. Función de Duf y Sns durante estadios tempranos del desarrollo de los nefrocitos

Durante los estadios embrionarios 11, 12 y parte del 13 todos los nefrocitos en guirnalda expresan Sns y Duf, pero a diferencia de estadios posteriores las proteínas se acumulan en las membranas de las zonas de contacto celular. A nivel ultraestructural durante estos estadios observamos placas densas a los electrones en los lugares de contacto celular que recuerdan a uniones adherentes. Aunque no hemos realizado estudios de inmunomicroscopía electrónica en estos estadios, los datos de inmunohistoquímica usando los anticuerpos anti-Duf y anti-Sns, sugieren que probablemente ambas proteínas se localicen en las placas densas. Así, nos preguntamos que papel podrían tener Duf y Sns en estadios embrionarios tempranos. Hemos observado que en ausencia de cada una de estas proteínas no hay cambios en la apariencia de las uniones adherentes entre los nefrocitos. Además, en estos estadios no se detectan cambios aparentes ni en los niveles ni en la localización de la proteína que queda mediante tinciones con anticuerpos. Estos datos podrían indicar que ó bien las uniones adherentes entre células no dependen de las IRM, pudiendo estar mediadas por otras proteínas de reconocimiento celular como las cadherinas, ó bien que pudieran depender de las IRM, pero en este caso las uniones adherentes estarían mediadas por interacciones homotípicas. Para diferenciar entre ambas posibilidades nos proponemos analizar que ocurre con la formación de estas placas densas en embriones de estadios tempranos en ausencia de Duf y de Sns (en individuos *Df(1)w^{67k30}; sns^{XB3}*).

4. Función de Duf y Sns durante estadios tardíos del desarrollo de los nefrocitos

Hemos observado como evoluciona el patrón de expresión de Duf y Sns en el periodo de desarrollo comprendido desde el estadio 13 embrionario hasta el tercer estadio larvario,. Ambas proteínas pasan de colocalizar sólo en las regiones de contactos entre células (como habíamos observado en estadios más tempranos) a hacerlo también en regiones adicionales de la membrana, hasta que en tercer estadio larvario Duf y Sns perfilan el contorno de las células. Aunque si bien es cierto, la observación detallada revela un patrón discontinuo dentro de la membrana plasmática. Ultraestructuralmente hemos determinado que a partir del estadio 13 comenzamos a observar la formación de canales de laberintina y diafragmas de filtración, que van aumentando en número hasta que en tercer estadio larvario cubren toda la superficie de membrana celular. En este estadio nuestros colaboradores han analizado la localización exacta de Duf y Sns mediante inmunomicroscopía electrónica, y han observado que ambas se localizan físicamente en las regiones de membrana que contienen los diafragmas que recubren las aberturas de los canales de laberintina, de hecho, se localizan en dichos diafragmas. Esta localización nos hizo preguntarnos si Duf y Sns eran requeridas ó no para la formación de los diafragmas de filtración. Para ello generamos deficiencias *duf* y elaboramos una línea transformante *UAS-ARNi-sns*, mediante las cuales hemos podido analizar el requerimiento de ambas proteínas a lo largo de todo el desarrollo de los nefrocitos en guirnalda. Así, hemos comprobado que la formación de los diafragmas de filtración requiere de la expresión tanto de Duf como de Sns. Además comprobamos que la expresión de la línea transformante *UAS-ARNi-sns* con *Prospero-GAL4* presenta un fenotipo severo, con desorganización de los diafragmas de filtración, aunque *Prospero-GAL4* sólo se expresa a partir del estadio 16 en los nefrocitos, momento en el cual los diafragmas ya se han formado. Por lo que podemos concluir que la función de *sns* es necesaria no sólo para la formación, sino también para el mantenimiento de los diafragmas.

5. Similitud en el desarrollo de los nefrocitos y los podocitos durante estadios tempranos y tardíos

Durante el proceso de glomerulogénesis que va a dar lugar al desarrollo del sistema excretor de vertebrados se observan cambios en las propiedades de asociación de los podocitos que recuerdan a las que hemos descrito en el caso de los nefrocitos. Así, en estadios tempranos los podocitos forman un epitelio columnar y están conectados lateralmente por uniones celulares del tipo “tight junction”. Posteriormente, a medida que se produce la maduración de los podocitos, estas uniones desaparecen y comienzan a formarse los diafragmas de filtración, hasta que sólo están presentes estos últimos en el podocito maduro (Kreidberg, 2003). La proteína nephrin (ortólogo de Sns) en estadios tempranos se asocia a las “tight junction” y a medida que aparecen los diafragmas de filtración se va concentrando en estas uniones como se ha podido comprobar mediante inmunomicroscopía electrónica (Ruotsalainen y cols., 2000). Por lo tanto a nivel de diferenciación y desarrollo de las células que cumplen una función

filtradora en ambos sistemas excretores, encontramos también semejanzas entre los nefrocitos en guirnalda y los podocitos. En ambos tipos celulares se observa una evolución desde un tipo de unión adherente (presencia de placa densa a los electrones en micrografías electrónicas), donde se localizan las proteínas IRM y que abundan en estadios tempranos del desarrollo, a la formación de los diafragmas de filtración que sustituyen a éstas y donde de nuevo colocan las proteínas IRM.

6. Polychaetoid interacciona con Duf y es esencial para la formación de los diafragmas de filtración de los nefrocitos

Como hemos señalado con anterioridad, las proteínas IRM, Duf y Sns se coexpresan en los nefrocitos de *Drosophila*, por lo que existe la posibilidad de crear complejos multiprotéicos diferentes a los que operan durante miogénesis. Nuestros datos apuntan a que este es el caso. Hemos comprobado que otras proteínas esenciales para el proceso de fusión en el músculo están ausentes en los nefrocitos en guirnalda, mientras que éstos expresan proteínas ortólogas de algunos de los componentes del diafragma de filtración de los podocitos, como son: Zonula occludens 1 (ZO-1), podocina y CD2AP (CD2-associated protein). Nuestros estudios se han centrado en el posible papel funcional de la proteína Pyd (ortólogo de ZO-1) en los nefrocitos. Esta elección fue tomada por dos razones principales: en primer lugar por su probable interacción directa con Duf y en segundo lugar debido a la ausencia de información referente al fenotipo de falta de función de ZO-1 en los podocitos de vertebrados. Este desconocimiento se debe en gran parte a las dificultades para abordar el análisis de falta de función de ZO-1 en riñones adultos, ya que esta proteína se expresa y requiere en gran cantidad de tejidos desde estadios embrionarios.

Para poder dilucidar si Pyd interaccionaba con Duf (al igual que hace ZO-1 con NEPH1 en el sistema excretor de vertebrados) realizamos experimentos de coimmunoprecipitación de Duf y Pyd en células en cultivo S2, comprobando que ambas se hallan en el mismo complejo proteico. Aunque la proteína Pyd carece de dominios transmembrana y posee características que sugieren su acumulación citoplasmática, en nuestros ensayos celulares observamos que se encuentra asociada a la membrana incluso en células que no tienen Duf, lo que indica que se puede asociar a otras proteínas de membrana. Sin embargo, hemos descrito una colocalización con Duf en células cotransfectadas con Pyd y Duf, y lo que es más llamativo, un cambio en su localización en respuesta a la concentración de Duf en zonas de contacto celular en agregados. Estos datos refuerzan nuestra conclusión de que ambas proteínas forman parte del mismo complejo, y sugiere que la asociación de Duf y Pyd se podría producir tras el reclutamiento de Duf a complejos oligoméricos, que se formarían en respuesta a la interacción homotípica en trans responsable de la agregación celular (Figura 39). Por analogía con lo descrito en las células S2, propoemos que en los nefrocitos en guirnalda Pyd también se localiza en las regiones citoplasmáticas desde las cuales se expanden los diafragmas de filtración, donde forma parte de un complejo multiprotéico que contiene a Duf y Sns. La generación de un anticuerpo específico contra Pyd nos permitirá demostrar dicha hipótesis.

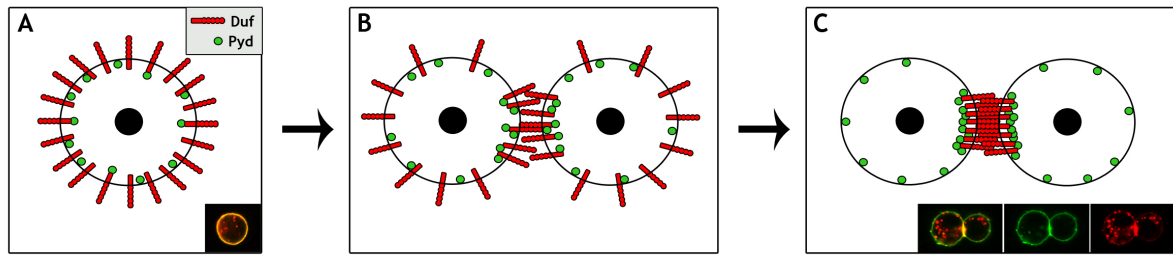


Figura 39.- Asociación de Duf y Pyd en células S2. (A-C) Esquemas de células S2 en las que se representa la localización de Duf (rojo) y Pyd-V5 (verde), en condiciones de aislamiento (A) y cuando forman agregados de dos células (B y C). Los esquemas A y C se encuentran acompañados de sus respectivas imágenes de células S2 teñidas con anti-Duf_{int} (rojo) y anti-V5 (verde). Cuando las células S2 cotransfectadas con Pyd y Duf se encuentran aisladas, ambas proteínas se encuentran a lo largo de la membrana plasmática (A). Al contactar dos células la región extracelular de Duf va interaccionando homotípicamente in trans siendo reclutada al lugar de contacto celular (B), hasta que queda restringida a esta región de membrana, donde Pyd ahora es también reclutada, aunque sigue viéndose también en el resto de la membrana plasmática (C).

Además de demostrar la interacción con Duf, hemos podido analizar a nivel ultraestructural el requerimiento de Pyd en los nefrocitos en guirnalda. Así, observamos que en ausencia de Pyd no se forman los diafragmas de filtración y en tercer estadio larvario detectamos uniones adherentes en las zonas de contacto celular, que explican su apariencia aglutinada al diseccionarlas y su aspecto superficial en micrografías electrónicas de barrido. Pensamos que la interacción de Pyd con Duf podría ser necesaria para la estabilización de Duf y por consiguiente también de Sns. Así, comprobamos que en mutantes *pyd^{dam}* ambas proteínas, Duf y Sns, colocalizan en las zonas de contacto celular en nefrocitos de tercer estadio larvario, recordándonos la localización de ambas en estadios embrionarios tempranos del desarrollo de individuos silvestres. La presencia de uniones adherentes en tercer estadio larvario donde se acumulan Duf y Sns nos sugiere que Pyd es necesaria para la transición de uniones adherentes a diafragmas de filtración en los nefrocitos de *Drosophila*. De esta forma, proponemos que Pyd estaría implicada en la localización y/o estabilización del complejo multiproteico formado por Duf y Sns en las regiones de formación de los diafragmas de filtración, posiblemente por el reclutamiento a dicho complejo de elementos adicionales. El análisis de localización de Pyd en los nefrocitos a lo largo del desarrollo, nos permitirá determinar si efectivamente su presencia en la membrana coincide con la transición de uniones adherentes a diafragmas de filtración, y si esta transición coincide con un cambio en la localización subcelular del complejo Duf/Sns de una posición más apical, a otra subapical, donde se forman los diafragmas. Por otro lado, experimentos de rescate con la línea *UAS-pyd* a diferentes tiempos nos permitirán en un futuro próximo evaluar la función de Pyd durante el desarrollo normal y en condiciones que simulen regeneración.

En los experimentos de coimmunoprecipitación de Duf y Pyd realizados en cultivos celulares detectamos, en los “Western blots”, una banda correspondiente en tamaño a la zona transmembrana más la citoplásmica de Duf que se reconocía con el anticuerpo dirigido contra la región intracelular de Duf. Dicha banda podía derivar de un procesamiento proteolítico

que también podría ocurrir tanto en los músculos como en los nefrocitos. Para comprobar si este procesamiento tenía lugar “in vivo” sobreexpresamos la línea *UAS-duf-GFP* en los músculos de *Drosophila*, sin que pudiéramos detectar la forma procesada de la proteína. Estamos interesados en estudiar si este procesamiento podría suceder en los nefrocitos y si es así, estudiar la repercusión que dicho procesamiento pueda tener sobre la función de Duf.

7. Duf y Sns se requieren para la función filtradora de los nefrocitos de *Drosophila*

Una vez caracterizado el fenotipo de ausencia de diafragmas de filtración y de canales de laberintina en los mutantes de falta de función de *duf* y *sns*, nos preguntamos cuál sería la repercusión funcional que la ausencia de los canales podría tener sobre la función filtradora de los nefrocitos. Para ello realizamos experimentos en los que comparamos la capacidad de retirada de productos tóxicos de la hemolinfa en larvas de tipo silvestre y de mutantes *duf*, tras suplementar la comida suministrada con metales pesados como cobre y plata. Pudimos comprobar que aunque los nefrocitos mutantes acumulaban plata, no eran eficientes a la hora de eliminarla de la hemolinfa, y en consecuencia la viabilidad de las larvas se veía comprometida. Para analizar más en detalle la capacidad endocítica de los nefrocitos en guirnalda, nuestros colaboradores en el laboratorio de Helen Skaer realizaron experimentos de endocitosis utilizando dextranos de peso molecular 10.000 y 500.000 acoplados a distintos fluoróforos. En condiciones silvestres ambos dextranos son endocitados y se localizan en vesículas dentro de las células. En condiciones mutantes para *duf* ó para *sns* se ve como las partículas de menor tamaño pueden pasar al interior de la célula mientras que las de mayor tamaño quedan retenidas en la membrana basal donde forman una película que rodea a la célula (Weavers y cols., 2009). La interpretación de estos experimentos es que en condiciones silvestres las partículas de menor tamaño pasan a través del diafragma de filtración a los canales de laberintina donde son endocitadas, mientras que las de mayor tamaño no podrían atravesar los diafragmas y serían endocitadas en las zonas de la membrana más superficiales directamente en contacto con la membrana basal. Así, parece que los nefrocitos en guirnalda, de forma semejante a los podocitos, son capaces, mediante el diafragma de filtración de discriminar por tamaño las partículas que se filtran.

8. Idoneidad de los nefrocitos de *Drosophila* como modelo experimental de estudio de los podocitos de vertebrados

En esta tesis hemos demostrado la existencia de un alto paralelismo entre los podocitos renales y los nefrocitos de *Drosophila* (Figura 40). No sólo a nivel estructural sino también a nivel molecular y funcional, ya que los ortólogos de los genes que en vertebrados están implicados en la formación y mantenimiento del diafragma de filtración, NEPH1 y nephrin, están presentes en los nefrocitos de *Drosophila*, donde desempeñan una función análoga. Así, Duf y Sns se localizan en la membrana de los nefrocitos y son esenciales para la formación de los diafragmas de filtración. Tanto es así que en las condiciones mutantes generadas para Duf y

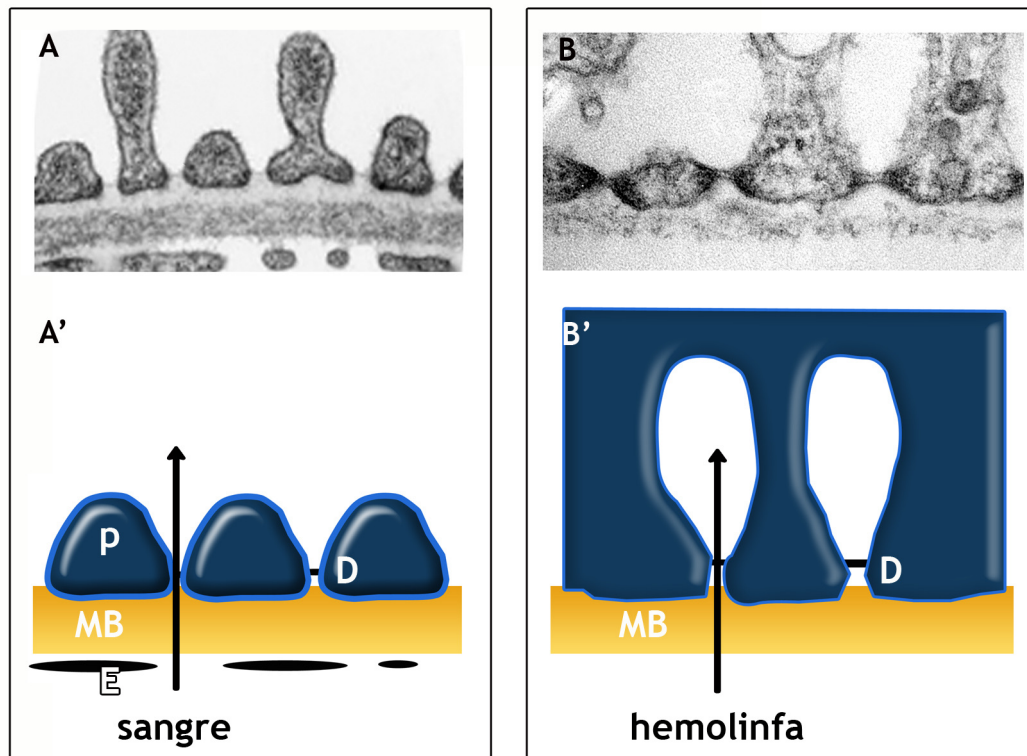


Figura 40.- Analogía ultraestructural de los podocitos renales y los nefrocitos en guirnalda de *Drosophila*. (A-B) Micrografías electrónicas de transmisión correspondientes a la barrera de filtración de riñones de ratas (A, imagen procedente de Pavenstädt y cols., 2003) y de nefrocitos en guirnalda de larvas de tercer estadio de *Drosophila* (B). En A' y B' se muestran representaciones esquemáticas de ambas micrografías. En vertebrados el filtrado (flecha negra) pasa desde la sangre al espacio urinario atravesando las fenestraciones del endotelio (E), la membrana basal (MB) y los diafragmas de filtración (D) de los pedicelos (P). En *Drosophila* la hemolinfa se filtra atravesando la MB y los diafragmas de filtración (D) al interior de los canales de laberintina

Si el diafragma de filtración nunca se forma y su ausencia afecta a la función filtradora de la hemolinfa llevada a cabo por los nefrocitos. Estos defectos son similares a los que se describen en vertebrados, donde las mutaciones en nephrin y NEPH1 producen síndromes nefríticos congénitos y fallos en la función renal asociados a proteinuria (Faul y cols., 2007; Patrakka y Tryggvason, 2007).

El gran paralelismo entre ambos sistemas puede ser un indicio de que quizás los sistemas excretores de los organismos vertebrados e invertebrados evolucionaron a partir del sistema excretor de un antecesor común. Sin embargo existen diferencias importantes, por lo que siempre se ha pensado que dichos sistemas no estaban relacionados. En el sistema excretor de vertebrados, para formar la orina primero tiene que tener lugar la filtración de la sangre en los glomérulos del riñón y después este primer filtrado sufre modificaciones en los túbulos uriníferos. En *Drosophila*, donde no existe un sistema de circulación cerrado, estas funciones están físicamente separadas y la función filtradora de la hemolinfa la llevan a cabo los nefrocitos, mientras que la modificación de la hemolinfa tiene lugar en los túbulos de malpigio.

Nuestros estudios han demostrado también que los nefrocitos de *Drosophila* constituyen un modelo experimental válido para el estudio del desarrollo y funcionalidad de diafragma de filtración. Así, aunque se han identificado muchos componentes del complejo del diafragma de filtración de los podocitos, la función de dichas proteínas durante el desarrollo no ha podido evaluarse debido a la inaccesibilidad de los riñones en el útero y al papel fundamental que cumplen los riñones en el proceso de limpieza de la sangre, siendo su disfunción incompatible con la viabilidad del individuo. Un ejemplo paradigmático lo constituye el análisis funcional de *pyd* que hemos llevado a cabo en los nefrocitos. Dado el requerimiento de ZO-1, el ortólogo de Pyd, en la formación de las uniones adherentes de gran variedad de tipos celulares, no se ha podido analizar su contribución a la funcionalidad del diafragma de filtración. Nosotros hemos utilizado las ventajas que *Drosophila* tiene como modelo de experimentación animal para demostrar que Pyd se requiere para la formación del diafragma de filtración, posiblemente modificando las propiedades de asociación de las proteínas IRM y permitiendo la evolución de uniones adherentes a diafragmas de filtración. Por este motivo, aunque por el momento el ratón parece ser el mejor modelo animal para el estudio de la función de los podocitos, tanto en condiciones normales como en fisiopatológicas, nosotros nos proponemos usar *Drosophila* como sistema modelo ideal para realizar estudios que no son posibles en mamíferos, sobre todo los relacionados con desarrollo y reparación, dada la dificultad que supone el acceso al riñón en desarrollo en el útero y la letalidad asociada a fallos renales. Así, además de las ventajas clásicas de *Drosophila* como organismo experimental, que incluyen la disponibilidad de gran número de progenie en un tiempo muy corto, la disponibilidad y facilidad de obtención de mutantes en los genes de interés, así como la posibilidad de modificar la función génica de manera condicional a lo largo del desarrollo, los nefrocitos presentan ventajas únicas respecto a los modelos de mamíferos. Las más evidentes son la posibilidad de fácil acceso a los nefrocitos durante todo el desarrollo y la de analizar las consecuencias de la falta de función de genes implicados en la formación y estabilidad de los diafragmas de filtración, debido a la dispensabilidad de los nefrocitos para la supervivencia de las moscas.

8

CONCLUSIONES

1- Dumbfounded (Duf) y Sticks and stones (Sns), dos proteínas de la SF-Ig, se coexpresan a lo largo del desarrollo en los nefrocitos en guirnalda de *Drosophila*. Durante la embriogénesis su localización en membrana varía desde una acumulación de ambas proteínas en regiones de contacto celular entre nefrocitos (estadio 11) hasta un patrón ribeteado (estadio 16), que se mantiene en los nefrocitos maduros (tercer estadio larvario) y que dibuja la localización de los diafragmas de filtración. Asimismo, sus respectivos parálogos Roughest y Hibris, no se expresan en nefrocitos durante la embriogénesis.

2- A pesar de que los nefrocitos en guirnalda son binucleados, la función de Duf y Sns en estas células no está relacionada con el proceso de fusión. Así en mutantes *duf*, *sns* y en otros genes que participan en fusión, como *myoblast city* y *rolling pebbles*, los nefrocitos son binucleados. Sin embargo, en mutantes que afectan al ciclo celular como *ciclinaA*, los nefrocitos sólo contiene un núcleo. Por lo que sugerimos que la naturaleza binucleada de estas células se debe a un proceso de división no acompañado de citoquinesis.

3- Duf y Sns son necesarios para la formación de una unión especializada, denominada diafragma de filtración, que limita la apertura de los canales de laberintina presentes en los nefrocitos en guirnalda a partir del estadio 14 embrionario. Así, en ausencia de Duf y Sns no se forman diafragmas de filtración ni canales de laberintina. En su lugar, el análisis ultraestructural de los nefrocitos mutantes de tercer estadio larvario, revela la presencia de numerosas uniones adherentes en zonas de contacto celular, características de estadios embrionarios tempranos.

4- En ausencia de Duf la funcionalidad de los nefrocitos, relacionada con la eliminación de sustancias tóxicas de la hemolinfa, está alterada como se muestra por la mayor intolerancia a la administración de metales pesados en la dieta.

5- Existe una interdependencia entre Duf y Sns para la estabilidad de ambas en la membrana de los nefrocitos, sugiriendo que forman parte del mismo complejo multiprotéico, como sus ortólogos en vertebrados NEPH1 y nephrin. Dicho complejo es diferente al que opera durante el proceso de fusión ya que entre sus componentes se incluyen proteínas ortólogas a las que constituyen el diafragma de filtración de los podocitos renales, como es el caso de Polychaetoid (Pyd), el ortólogo de ZO-1.

6- Al igual que sus ortólogos humanos ZO-1 y NEPH1, Polychaetoid interacciona con Duf en células S2 de *Drosophila*.

7- Pyd se expresa en los nefrocitos en guirnalda desde estadio 13 embrionario hasta tercer estadio larvario. En el mutante *pyd^{tam}* no se detecta expresión de *pyd* en nefrocitos y los diafragmas de filtración no se forman. Así, en larvas de tercer estadio larvario se observan uniones adherentes entre células similares a las presentes en estadios más tempranos del desarrollo en el tipo silvestre.

8- En ausencia de Pyd se altera la localización de Duf y Sns en la membrana de los nefrocitos maduros, de manera que en estadios larvarios ambas colocalizan en zonas de contacto celular, recordando a estadios más tempranos del desarrollo. Por lo que proponemos que Pyd podría estar mediando la transición de uniones adherentes a diafragmas de filtración durante el proceso de maduración de los nefrocitos.

9- Nuestros datos revelan similitudes a nivel molecular, morfológico y funcional entre los nefrocitos de *Drosophila* y los podocitos del riñón de vertebrados y demuestran la dispensabilidad de los diafragmas de filtración para la viabilidad de las moscas adultas. Por ello, proponemos que los nefrocitos en guirnalda de *Drosophila* son un modelo experimental único para realizar estudios que no son posibles en mamíferos, sobre todo los relacionados con desarrollo y reparación del diafragma de filtración, dada la dificultad que supone el acceso al riñón en desarrollo en el útero y la letalidad asociada a fallos renales.

10- La ausencia de *duf* en la deficiencia *Df(1)duf^{sps1}* provoca una disminución en el número de fusiones de mioblastos mucho mayor a la cuantificada para los mutantes *rst*. Por lo que concluimos que la contribución de Duf al proceso de fusión es mayor que la de Rst.

9

BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, S. K. y King, R. C.** (1967). The ultrastructure of the wreath cells of *Drosophila melanogaster* larvae. *Protoplasma* **63**, 343-352.
- Araujo, H., Machado, L. C., Octacilio-Silva, S., Mizutani, C. M., Silva, M. J. y Ramos, R. G.** (2003). Requirement of the roughest gene for differentiation and time of death of interommatidial cells during pupal stages of *Drosophila* compound eye development. *Mech Dev* **120**, 537-547.
- Artero, R. D., Castanon, I. y Baylies, M. K.** (2001). The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development* **128**, 4251-4264.
- Bao, S. y Cagan, R.** (2005). Preferential adhesion mediated by Hibris and Roughest regulates morphogenesis and patterning in the *Drosophila* eye. *Dev Cell* **8**, 925-935.
- Barletta, G. M., Kovari, I. A., Verma, R. K., Kerjaschki, D. y Holzman, L. B.** (2003). Neph1 and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem* **278**, 19266-19271.
- Bate, M.** (1993). The mesoderm and its derivatives. In *The development of Drosophila melanogaster*, vol. 2 (ed. M. Bate y A. Martinez-Arias), pp. 1013-1090. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bate, M. y Rushton, E.** (1993). Myogenesis and muscle patterning in *Drosophila*. *C R Acad Sci III* **316**, 1047-1061.
- Bate, M., Rushton, E. y Currie, D. A.** (1991). Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*. *Development* **113**, 79-89.
- Bate, M., Rushton, E. y Frasch, M.** (1993). A dual requirement for neurogenic genes in *Drosophila* myogenesis. *Dev Suppl*, 149-161.
- Benzing, T.** (2004). Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* **15**, 1382-1391.
- Berger, S., Schafer, G., Kesper, D. A., Holz, A., Eriksson, T., Palmer, R. H., Beck, L., Klambt, C., Renkawitz-Pohl, R. y Onel, S. F.** (2008). WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *J Cell Sci* **121**, 1303-1313.
- Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F. y Basler, K.** (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3312-3317.
- Bour, B. A., Chakravarti, M., West, J. M. y Abmayr, S. M.** (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev* **14**, 1498-1511.
- Brand, A. H. y Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Brockhouse, A. C., Horner, H. T., Booth, T. F. y Bonning, B. C.** (1999). Pericardial cell ultrastructure in the tobacco hornworm. *International Journal of Insect Morphology and*

Embryology **28**, 261-271.

Carmena, A., Bate, M. y Jimenez, F. (1995). Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* **9**, 2373-2383.

Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F. y Michelson, A. M. (1998a). Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev* **12**, 3910-3922.

Carmena, A., Murugasu-Oei, B., Menon, D., Jimenez, F. y Chia, W. (1998b). Inscuteable and numb mediate asymmetric muscle progenitor cell divisions during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev* **12**, 304-315.

Carrasco-Rando, M. y Ruiz-Gomez, M. (2008). Mind bomb 2, a founder myoblast-specific protein, regulates myoblast fusion and muscle stability. *Development* **135**, 849-857.

Chang, H. C., Newmyer, S. L., Hull, M. J., Ebersold, M., Schmid, S. L. y Mellman, I. (2002). Hsc70 is required for endocytosis and clathrin function in *Drosophila*. *J Cell Biol* **159**, 477-487.

Chao, D. L. y Shen, K. (2008). Functional dissection of SYG-1 and SYG-2, cell adhesion molecules required for selective synaptogenesis in *C. elegans*. *Mol Cell Neurosci* **39**, 248-257.

Chen, C. M., Freedman, J. A., Bettler, D. R., Jr., Manning, S. D., Giep, S. N., Steiner, J. y Ellis, H. M. (1996). Polychaetoid is required to restrict segregation of sensory organ precursors from proneural clusters in *Drosophila*. *Mech Dev* **57**, 215-227.

Chen, E. H. y Olson, E. N. (2001). Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell* **1**, 705-715.

Cubas, P., de Celis, J. F., Campuzano, S. y Modolell, J. (1991). Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev* **5**, 996-1008.

Dallai, R., Giovanna, M. y Callaini, G. (1993). The cytoskeleton of the ventral nephrocyte of *Ceratitis capitata* larva. *Cell and Tissue Res* **275**, 529-536.

Das, D., Aradhya, R., Ashoka, D. y Inamdar, M. (2008). Macromolecular uptake in *Drosophila* pericardial cells requires rudhira function. *Exp Cell Res* **314**, 1804-1810.

de Velasco, B., Mandal, L., Mkrtchyan, M. y Hartenstein, V. (2006). Subdivision and developmental fate of the head mesoderm in *Drosophila melanogaster*. *Dev Genes Evol* **216**, 39-51.

Doberstein, S. K., Fetter, R. D., Mehta, A. Y. y Goodman, C. S. (1997). Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol* **136**, 1249-1261.

Donoviel, D. B., Freed, D. D., Vogel, H., Potter, D. G., Hawkins, E., Barrish, J. P., Mathur, B. N., Turner, C. A., Geske, R., Montgomery, C. A. y cols. (2001). Proteinuria and perinatal

lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* **21**, 4829-4836.

Dutta, D., Anant, S., Ruiz-Gomez, M., Bate, M. y VijayRaghavan, K. (2004). Founder myoblasts and fibre number during adult myogenesis in *Drosophila*. *Development* **131**, 3761-3772.

Dworak, H. A., Charles, M. A., Pellerano, L. B. y Sink, H. (2001). Characterization of *Drosophila* hibris, a gene related to human nephrin. *Development* **128**, 4265-4276.

Erickson, M. R., Galletta, B. J. y Abmayr, S. M. (1997). *Drosophila* myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* **138**, 589-603.

Fanning, A. S., Ma, T. Y. y Anderson, J. M. (2002). Isolation and functional characterization of the actin binding region in the tight junction protein ZO-1. *Faseb J* **16**, 1835-1837.

Farquhar, M. G. (2006). The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. *J Clin Invest* **116**, 2090-2093.

Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K. y Mundel, P. (2007). Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **17**, 428-437.

Fischbach, K. F., Linneweber, G. A., Felix Malte Andlauer, T., Hertenstein, A., Bonengel, B. y Chaudhary, K. (2009). The Irre Cell Recognition Module (IRM) Proteins. *J Neurogenet*, 1-20.

Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H. y Levine, M. (1987). Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*. *Embo J* **6**, 749-759.

Galletta, B. J., Chakravarti, M., Banerjee, R. y Abmayr, S. M. (2004). SNS: Adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in S2 cells and embryonic myoblasts. *Mech Dev* **121**, 1455-1468.

Garg, P., Verma, R. y Holzman, L. B. (2007). Slit diaphragm junctional complex and regulation of the cytoskeleton. *Nephron Exp Nephrol* **106**, e67-72.

Gerke, P., Huber, T. B., Sellin, L., Benzing, T. y Walz, G. (2003). Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol* **14**, 918-926.

Goriely, A., Dumont, N., Dambly-Chaudiere, C. y Ghysen, A. (1991). The determination of sense organs in *Drosophila*: effect of the neurogenic mutations in the embryo. *Development* **113**, 1395-1404.

Guo, G., Morrison, D. J., Licht, J. D. y Quaggin, S. E. (2004). WT1 activates a glomerular-specific enhancer identified from the human nephrin gene. *J Am Soc Nephrol* **15**, 2851-2856.

Hakeda, S., Endo, S. y Saigo, K. (2000). Requirements of Kettin, a giant muscle protein highly conserved in overall structure in evolution, for normal muscle function, viability, and flight activity of *Drosophila*. *J Cell Biol* **148**, 101-114.

- Haraldsson, B., Nystrom, J. y Deen, W. M.** (2008). Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* **88**, 451-487.
- Harrat, A., Sleiman, I. y Schoeller-Raccaud, J.** (1999). Development of the subesophageal body during embryogenesis without diapause in *Locusta migratoria* (Linnaeus) (Orthoptera: Acrididae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **28**, 27-39.
- Hartenstein, V.** (1993). Atlas of Drosophila Development: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Huber, T. B., Kottgen, M., Schilling, B., Walz, G. y Benzing, T.** (2001). Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem* **276**, 41543-41546.
- Huber, T. B., Schmidts, M., Gerke, P., Schermer, B., Zahn, A., Hartleben, B., Sellin, L., Walz, G. y Benzing, T.** (2003). The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. *J Biol Chem* **278**, 13417-13421.
- Jarad, G., Cunningham, J., Shaw, A. S. y Miner, J. H.** (2006). Proteinuria precedes podocyte abnormalities in *Lamb2*^{-/-} mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. *J Clin Invest* **116**, 2272-2279.
- Jung, A. C., Ribeiro, C., Michaut, L., Certa, U. y Affolter, M.** (2006). Polychaetoid/ZO-1 is required for cell specification and rearrangement during Drosophila tracheal morphogenesis. *Curr Biol* **16**, 1224-1231.
- Kawachi, H., Koike, H. y Shimizu, F.** (2002). Molecular structure and function of the slit diaphragm: expression of nephrin in proteinuric states and in developing glomeruli. *Nephrol Dial Transplant* **17 Suppl 9**, 20-22.
- Kawachi, H., Miyauchi, N., Suzuki, K., Han, G. D., Orikasa, M. y Shimizu, F.** (2006). Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton)* **11**, 274-281.
- Kelso, R. J., Buszczak, M., Quinones, A. T., Castiblanco, C., Mazzalupo, S. y Cooley, L.** (2004). Flytrap, a database documenting a GFP protein-trap insertion screen in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* **32**, D418-420.
- Kesper, D. A., Stute, C., Buttgerit, D., Kreiskother, N., Vishnu, S., Fischbach, K. F. y Renkawitz-Pohl, R.** (2007). Myoblast fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). *Dev Dyn* **236**, 404-415.
- Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R. y cols.** (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* **1**, 575-582.
- Khoshnoodi, J., Sigmundsson, K., Ofverstedt, L. G., Skoglund, U., Obrink, B., Wartiovaara, J. y Tryggvason, K.** (2003). Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. *Am J Pathol* **163**, 2337-2346.
- King, R. C., Aggarwal, S. K. y Bodenstein, D.** (1966). The comparative submicroscopic morphology of the ring gland of *Drosophila melanogaster* during the second and third larval instars. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **73**, 272-285.

Kocherlakota, K. S., Wu, J. M., McDermott, J. y Abmayr, S. M. (2008). Analysis of the cell adhesion molecule sticks-and-stones reveals multiple redundant functional domains, protein-interaction motifs and phosphorylated tyrosines that direct myoblast fusion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **178**, 1371-1383.

Kosaka, T. y Ikeda, K. (1983). Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets1. *J Cell Biol* **97**, 499-507.

Kreidberg, J. A. (2003). Podocyte differentiation and glomerulogenesis. *J Am Soc Nephrol* **14**, 806-814.

Kumar, V., Abbas, A. y Fausto, N. (2004). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease: Elsevier Science.

Lefevre, G., Jr. y Green, M. M. (1972). Genetic duplication in the white-split interval of the X chromosome in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **36**, 391-412.

Liu, G., Kaw, B., Kurfis, J., Rahmanuddin, S., Kanwar, Y. S. y Chugh, S. S. (2003). Nephl and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* **112**, 209-221.

Machado, C. y Andrew, D. J. (2000). D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J Cell Biol* **151**, 639-652.

Massarwa, R., Carmon, S., Shilo, B. Z. y Schejter, E. D. (2007). WIP/WASp-based actin-polymerization machinery is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev Cell* **12**, 557-569.

Menon, S. D. y Chia, W. (2001). *Drosophila* rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev Cell* **1**, 691-703.

Menon, S. D., Osman, Z., Chenchill, K. y Chia, W. (2005). A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*. *J Cell Biol* **169**, 909-920.

Nose, A., Isshiki, T. y Takeichi, M. (1998). Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the msh homeobox gene. *Development* **125**, 215-223.

Parks, A. L., Cook, K. R., Belvin, M., Dompe, N. A., Fawcett, R., Huppert, K., Tan, L. R., Winter, C. G., Bogart, K. P., Deal, J. E. y cols. (2004). Systematic generation of high-resolution deletion coverage of the *Drosophila melanogaster* genome. *Nat Genet* **36**, 288-292.

Patrakka, J. y Tryggvason, K. (2007). Nephrin--a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med* **13**, 396-403.

Pavenstadt, H., Kriz, W. y Kretzler, M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* **83**, 253-307.

- Ramos, R. G., Igloi, G. L., Lichte, B., Baumann, U., Maier, D., Schneider, T., Brandstatter, J. H., Frohlich, A. y Fischbach, K. F.** (1993). The irregular chiasm C-rough locus of *Drosophila*, which affects axonal projections and programmed cell death, encodes a novel immunoglobulin-like protein. *Genes Dev* **7**, 2533-2537.
- Ranganayakulu, G., Zhao, B., Dokidis, A., Molkentin, J. D., Olson, E. N. y Schulz, R. A.** (1995). A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol* **171**, 169-181.
- Reiter, C., Schimansky, T., Nie, Z. y Fischbach, K. F.** (1996). Reorganization of membrane contacts prior to apoptosis in the *Drosophila* retina: the role of the IrreC-rst protein. *Development* **122**, 1931-1940.
- Richardson, B., Beckett, K. y Baylies, M.** (2008a). Visualizing new dimensions in *Drosophila* myoblast fusion. *Bioessays* **30**, 423-431.
- Richardson, B. E., Beckett, K. y Baylies, M. K.** (2008b). Live imaging of *Drosophila* myoblast fusion. *Methods Mol Biol* **475**, 263-274.
- Richardson, B. E., Beckett, K., Nowak, S. J. y Baylies, M. K.** (2007). SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion. *Development* **134**, 4357-4367.
- Richardson, B. E., Nowak, S. J. y Baylies, M. K.** (2008c). Myoblast fusion in fly and vertebrates: new genes, new processes and new perspectives. *Traffic* **9**, 1050-1059.
- Roll-Mecak, A. y Vale, R. D.** (2005). The *Drosophila* homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules. *Curr Biol* **15**, 650-655.
- Ruiz Gomez, M. y Bate, M.** (1997). Segregation of myogenic lineages in *Drosophila* requires numb. *Development* **124**, 4857-4866.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M. V. y Bate, M.** (2000). *Drosophila* dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* **102**, 189-198.
- Ruiz-Gomez, M. y Ghysen, A.** (1993). The expression and role of a proneural gene, achaete, in the development of the larval nervous system of *Drosophila*. *Embo J* **12**, 1121-1130.
- Ruotsalainen, V., Patrakka, J., Tissari, P., Reponen, P., Hess, M., Kestila, M., Holmberg, C., Salonen, R., Heikinheimo, M., Wartiovaara, J. y cols.** (2000). Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. *Am J Pathol* **157**, 1905-1916.
- Rushton, E., Drysdale, R., Abmayr, S. M., Michelson, A. M. y Bate, M.** (1995). Mutations in a novel gene, myoblast city, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* **121**, 1979-1988.
- Sambrook, J., Fritsh, E. F. y Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satchell, S. C. y Braet, F.** (2009). Glomerular Endothelial Cell Fenestrations: an Integral Component of the Glomerular Filtration Barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*.

- Schneider, T., Reiter, C., Eule, E., Bader, B., Lichte, B., Nie, Z., Schimansky, T., Ramos, R. G. and Fischbach, K. F.** (1995). Restricted expression of the *irreC-rst* protein is required for normal axonal projections of columnar visual neurons. *Neuron* **15**, 259-271.
- Schwarz, K., Simons, M., Reiser, J., Saleem, M. A., Faul, C., Kriz, W., Shaw, A. S., Holzman, L. B. y Mundel, P.** (2001). Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* **108**, 1621-1629.
- Sellin, L., Huber, T. B., Gerke, P., Quack, I., Pavenstadt, H. y Walz, G.** (2003). NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *Faseb J* **17**, 115-117.
- Seppa, M. J., Johnson, R. I., Bao, S. y Cagan, R. L.** (2008). Polychaetoid controls patterning by modulating adhesion in the *Drosophila* pupal retina. *Dev Biol* **318**, 1-16.
- Shen, K. y Bargmann, C. I.** (2003). The immunoglobulin superfamily protein SYG-1 determines the location of specific synapses in *C. elegans*. *Cell* **112**, 619-630.
- Shen, K., Fetter, R. D. y Bargmann, C. I.** (2004). Synaptic specificity is generated by the synaptic guidepost protein SYG-2 and its receptor, SYG-1. *Cell* **116**, 869-881.
- Singh, A., Satchell, S. C., Neal, C. R., McKenzie, E. A., Tooke, J. E. y Mathieson, P. W.** (2007). Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J Am Soc Nephrol* **18**, 2885-2893.
- Snow, P. M., Patel, N. H., Harrelson, A. L. y Goodman, C. S.** (1987). Neural-specific carbohydrate moiety shared by many surface glycoproteins in *Drosophila* and grasshopper embryos. *J Neurosci* **7**, 4137-4144.
- Spradling, A. C. y Rubin, G. M.** (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-347.
- Strunkelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L. M., Hertenstein, A., de Couet, H. G., Ramos, R. G. y Fischbach, K. F.** (2001). *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* **128**, 4229-4239.
- Strunkelnberg, M., de Couet, H. G., Hertenstein, A. y Fischbach, K. F.** (2003). Interspecies comparison of a gene pair with partially redundant function: the *rst* and *kirre* genes in *D. virilis* and *D. melanogaster*. *J Mol Evol* **56**, 187-197.
- Swan, L. E., Wichmann, C., Prange, U., Schmid, A., Schmidt, M., Schwarz, T., Ponimaskin, E., Madeo, F., Vorbruggen, G. y Sigrist, S. J.** (2004). A glutamate receptor-interacting protein homolog organizes muscle guidance in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**, 223-237.
- Takahashi, K., Matsuo, T., Katsube, T., Ueda, R. y Yamamoto, D.** (1998). Direct binding between two PDZ domain proteins Canoe and ZO-1 and their roles in regulation of the jun N-terminal kinase pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Mech Dev* **78**, 97-111.
- Takahisa, M., Togashi, S., Suzuki, T., Kobayashi, M., Murayama, A., Kondo, K., Miyake, T. y Ueda, R.** (1996). The *Drosophila* *tamou* gene, a component of the activating pathway of extramacrochaetae expression, encodes a protein homologous to mammalian cell-cell junction-associated protein ZO-1. *Genes Dev* **10**, 1783-1795.

- Tautz, D. y Pfeifle, C.** (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-85.
- Tepass, U. y Hartenstein, V.** (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **161**, 563-596.
- Thibault, S. T., Singer, M. A., Miyazaki, W. Y., Milash, B., Dompe, N. A., Singh, C. M., Buchholz, R., Demsky, M., Fawcett, R., Francis-Lang, H. L. y cols.** (2004). A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nat Genet* **36**, 283-287.
- Tryggvason, K. y Pettersson, E.** (2003). Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *J Intern Med* **254**, 216-224.
- Tryggvason, K. y Wartiovaara, J.** (2001). Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**, 543-549.
- Wartiovaara, J., Ofverstedt, L. G., Khoshnoodi, J., Zhang, J., Makela, E., Sandin, S., Ruotsalainen, V., Cheng, R. H., Jalanko, H., Skoglund, U. y cols.** (2004). Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* **114**, 1475-1483.
- Weavers, H., Prieto-Sanchez, S., Grawe, F., Garcia-Lopez, A., Artero, R., Wilsch-Brauninger, M., Ruiz-Gomez, M., Skaer, H. y Denholm, B.** (2009). The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. *Nature* **457**, 322-326.
- Wei, X. y Ellis, H. M.** (2001). Localization of the *Drosophila* MAGUK protein Polychaetoid is controlled by alternative splicing. *Mech Dev* **100**, 217-231.
- Wolf, G. y Stahl, R. A.** (2003). CD2-associated protein and glomerular disease. *Lancet* **362**, 1746-1748.
- Zhang, Y., Featherstone, D., Davis, W., Rushton, E. y Broadie, K.** (2000). *Drosophila* D-titin is required for myoblast fusion and skeletal muscle striation. *J Cell Sci* **113** (Pt 17), 3103-3115.

10

PUBLICACIÓN

LETTERS

The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm

Helen Weavers^{1*}, Silvia Prieto-Sánchez^{2*}, Ferdinand Grawe³, Amparo Garcia-López⁴, Ruben Artero⁴, Michaela Wilsch-Bräuninger⁵, Mar Ruiz-Gómez², Helen Skaer¹ & Barry Denholm¹

The nephron is the basic structural and functional unit of the vertebrate kidney. It is composed of a glomerulus, the site of ultrafiltration, and a renal tubule, along which the filtrate is modified. Although widely regarded as a vertebrate adaptation¹, 'nephron-like' features can be found in the excretory systems of many invertebrates, raising the possibility that components of the vertebrate excretory system were inherited from their invertebrate ancestors². Here we show that the insect nephrocyte has remarkable anatomical, molecular and functional similarity to the glomerular podocyte, a cell in the vertebrate kidney that forms the main size-selective barrier as blood is ultrafiltered to make urine. In particular, both cell types possess a specialized filtration diaphragm, known as the slit diaphragm in podocytes or the nephrocyte diaphragm in nephrocytes. We find that fly (*Drosophila melanogaster*) orthologues of the major constituents of the slit diaphragm, including nephrin, NEPH1 (also known as KIRREL), CD2AP, ZO-1 (TJP1) and podocin, are expressed in the nephrocyte and form a complex of interacting proteins that closely mirrors the vertebrate slit diaphragm complex. Furthermore, we find that the nephrocyte diaphragm is completely lost in flies lacking the orthologues of nephrin or NEPH1—a phenotype resembling loss of the slit diaphragm in the absence of either nephrin (as in human congenital nephrotic syndrome of the Finnish type, NPHS1) or NEPH1. These changes markedly impair filtration function in the nephrocyte. The similarities we describe between invertebrate nephrocytes and vertebrate podocytes provide evidence suggesting that the two cell types are evolutionarily related, and establish the nephrocyte as a simple model in which to study podocyte biology and podocyte-associated diseases.

Filtration of blood in the vertebrate kidney occurs within the glomerulus of the nephron (Fig. 1a, b). The filtration barrier is formed by podocytes—specialized epithelial cells—which send out interdigitating foot processes to enwrap the glomerular capillaries. These processes are separated by 30–50-nm-wide slit pores spanned by the slit diaphragm^{3,4}, which, together with the glomerular basement membrane, form a size- and charge-selective filtration barrier (Fig. 1b). Disruption to this barrier in disease leads to leakage of blood proteins into the urinary space and to kidney failure⁵.

Although invertebrate excretory systems are considered to lack nephrons, 'nephron-like' components, such as filtration cells and ducts in which the filtrate is modified, are widespread (Fig. 1c)^{6,7}. Insect nephrocytes regulate haemolymph composition by filtration, followed by endocytosis and processing to sequester and/or secondarily metabolise toxic materials^{7–9}. *Drosophila* have two types of nephrocytes: garland and pericardial nephrocytes (Fig. 1e–g). They are tethered to the oesophagus (Figs 1g, 2d and 3g) or heart (Fig. 1f),

and are bathed in haemolymph. Extensive infolding of the plasma membrane generates a network of labyrinthine channels or lacunae flanked by nephrocyte foot processes (Fig. 1h). The channel entrances are narrow slits 30 nm in width, spanned by a single or double filament forming a specialized filtration junction—the nephrocyte diaphragm (Figs 1h, i and 3c). Each nephrocyte is enveloped by the basement membrane (Figs 1h and 3c). The nephrocyte diaphragm and basement membrane behave as a size- and charge-selective barrier^{7,9} (Fig. 1d) and filtrate is endocytosed from the sides of the lacunae. Thus, the anatomies of the nephrocyte and podocyte filtration barriers are remarkably similar³.

In view of this similarity, we investigated whether the nephrocyte diaphragm is molecularly related to the slit diaphragm. The major slit diaphragm components, the transmembrane immunoglobulin-domain superfamily proteins nephrin and NEPH1, are co-expressed in the podocyte and interact across the slit pore by homo- and heterotypic binding to form the diaphragm^{4,10–16}. Mutations in *NPHS1*, as in human congenital nephrotic syndrome of the Finnish type¹⁰, or in *NEPH1* (ref. 17) cause slit diaphragm loss and foot process effacement, resulting in breakdown of the filtration barrier and proteinuria.

Drosophila has two *NPHS1* orthologues—*sticks and stones* (*sns*) and *hibris* (*hbs*)—and two *NEPH1* orthologues—*dumbfounded* (*duf*, also known as *kirre*) and *roughest* (*rst*; Supplementary Table 1). Because *hbs* and *rst* are expressed in only a subset of nephrocytes (data not shown), we focus on *sns* and *duf*. *Sns* and *Duf* are expressed throughout life in both nephrocyte types (Figs 2a–g, adult data not shown), from mid-embryogenesis for garland cells (Supplementary Fig. 1 and Fig. 2a, b) and from the first larval instar for pericardial cells (Fig. 2c). Interestingly, the onset of *Sns* and *Duf* expression correlates in time with the appearance of the nephrocyte diaphragm at the ultrastructural level^{18,19}. Both proteins localize to the plasma membrane (Fig. 2d–g) and double-labelling reveals precise co-localization (Fig. 2h). This finding is initially surprising because in most contexts *Sns* and *Duf* are expressed in complementary patterns and mediate interactions between cells of different types. The only other situation in which the two types of immunoglobulin-domain proteins are co-expressed in the same cell is the vertebrate podocyte¹⁴. We find that *Sns* and *Duf* are dependent on each other for stabilization at the plasma membrane. Loss or knockdown of either protein in embryonic (Fig. 2i–l) or larval (Fig. 2m–p) nephrocytes leads to a loss, severe reduction or mislocalization of the other. These data demonstrate an essential interaction between the two proteins in the same cell, similar to that between nephrin and NEPH1 in the podocyte^{13–16}. The precise subcellular location of the proteins was revealed by immuno-electron microscopy. Both *Sns* and *Duf* specifically localize to the nephrocyte diaphragm (Fig. 2q–s) and

¹Department of Zoology, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EJ, UK. ²Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC, UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. ³Institut für Genetik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf D-40225, Germany. ⁴Department of Genetics, University of Valencia, Burjassot, Valencia 46100, Spain. ⁵Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden D-01307, Germany.

*These authors contributed equally to this work.

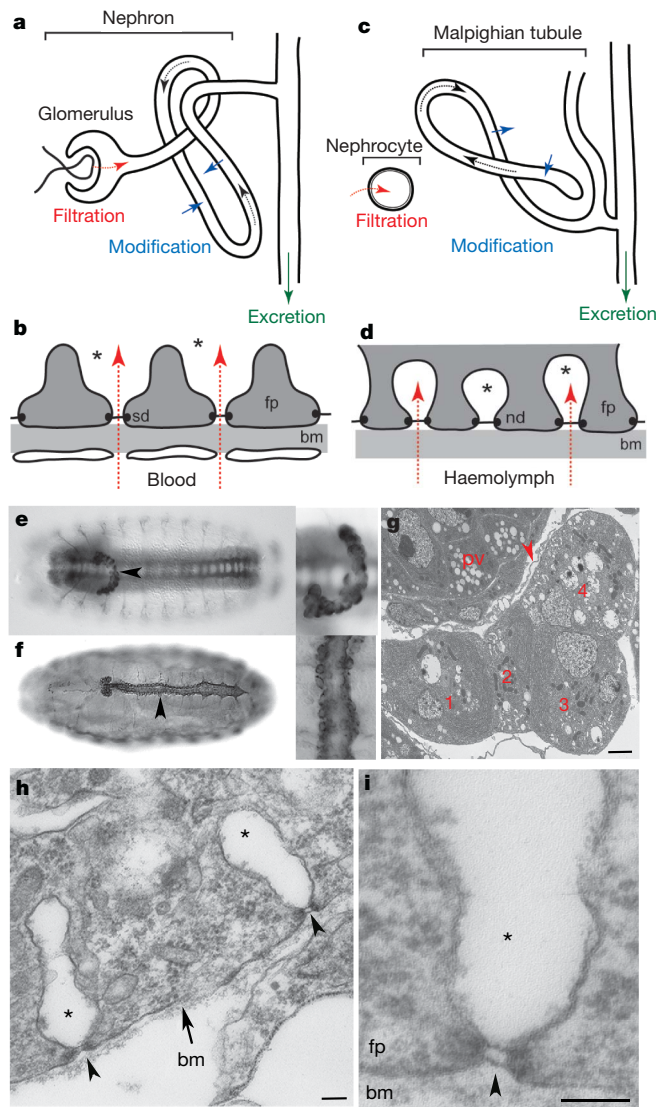


Figure 1 | The glomerular and nephrocyte filtration barriers are anatomically similar. **a–d**, Schematic drawings of the vertebrate nephron (**a**), glomerular filtration barrier (**b**), insect excretory system (**c**) and nephrocyte filtration barrier (**d**). Ultrafiltration (red arrow), filtrate flow (black arrow) and urinary space (**b**, asterisk) or extracellular lacunae (**d**, asterisk) are shown. bm, basement membrane; fp, foot process; nd, nephrocyte diaphragm; sd, slit diaphragm. **e, f**, *Drosophila* garland (anti-HRP, **e**) and pericardial (anti-pericardin, **f**) nephrocytes. Higher magnification images are shown to the right. **g–i**, Transmission electron micrographs of stage-16 embryonic garland nephrocytes. **g**, Four garland nephrocytes surrounding the proventriculus (pv); connective fibres (arrowhead). **h, i**, High magnification of the garland nephrocyte cell surface (**h**) and nephrocyte diaphragm (**i**) showing the nephrocyte diaphragm (arrowhead) and extracellular lacunae (asterisk). Scale bars: 2 µm (**g**) and 100 nm (**h, i**).

double-labelling reveals close co-localization between the two proteins (Fig. 2t, u).

Garland and pericardial nephrocytes are correctly specified in *sns* and *duf* mutants (Supplementary Fig. 2a–k). However, given the importance of the immunoglobulin-domain proteins in slit diaphragm formation, we examined the ultrastructure of the diaphragm in *sns* and *duf* mutants. In wild-type garland cells, nephrocyte diaphragms and associated lacunae appear during mid-embryogenesis (Supplementary Fig. 2l), progressively increasing in number (Fig. 1h). Diaphragms densely populate the cell periphery in third instar larvae (Fig. 3c). Notably, *sns* or *duf* mutant garland cells completely lack nephrocyte diaphragms at every stage, and lacunae are rarely detected

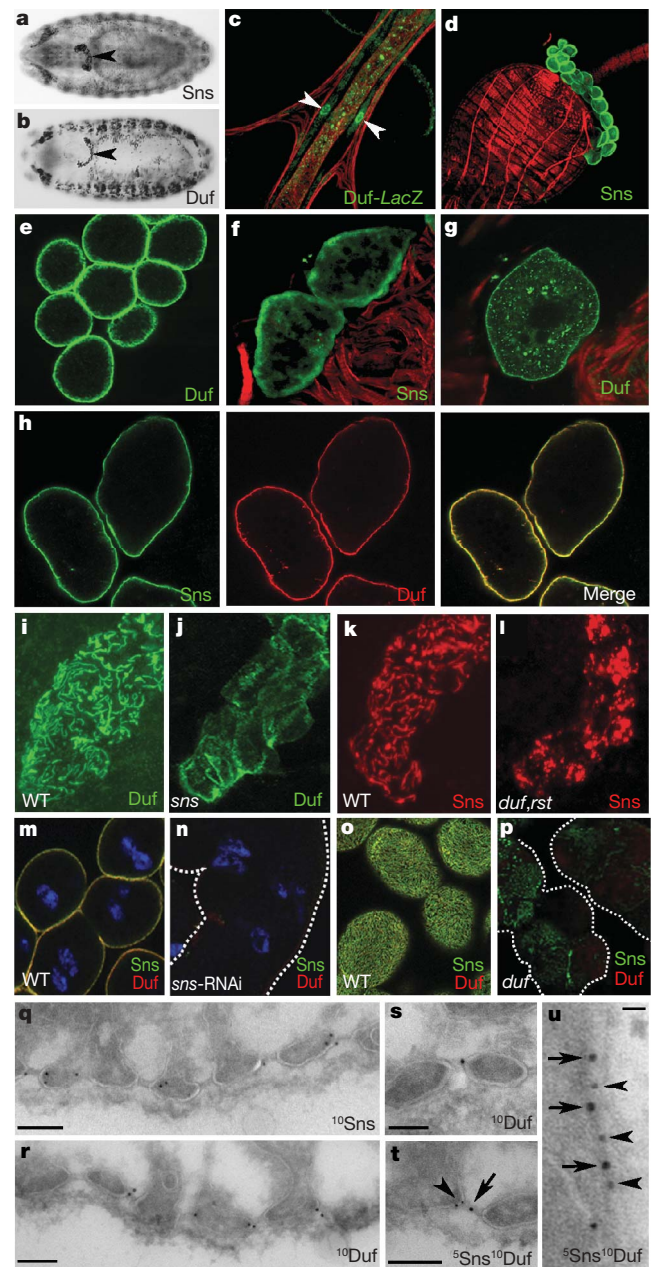


Figure 2 | Sns and Duf are expressed in *Drosophila* nephrocytes. **a–h**, Sns (**a, d, f, h**) and Duf (**b, c, e, g, h**) expression in garland (**a, b, d, e**) and pericardial (**c, f, g, h**) nephrocytes. Embryonic (**a, b**, arrowheads) and third instar larvae (**c, d**, arrowheads) are shown. The actin cytoskeleton has been counterstained in **c, d, f** and **g** (red). **h, i**, Sns (left, green) and Duf (centre, red) co-localize (right, yellow). **j–l**, Clusters of ~6–8 wild-type (WT; **j, k**), *sns* (**j**) or *duf,rst* (**l**) embryonic garland cells stained with anti-Duf (**j, l**) or anti-Sns (**k, l**). **m–p**, Wild-type (**m, o**), *sns*-RNAi (**n**) and *duf* (**p**) third instar garland cells stained for anti-Duf (red), anti-Sns (green; merge appears yellow) and DNA (blue). Single optical section (**m, n**) or z-projection of cell surface (**o, p**) are shown. **q–u**, Transmission electron micrographs of wild-type third instar garland cells immunogold-stained for anti-Sns (¹⁰Sns, **q**) or anti-Duf (¹⁰Duf, **r, s**), or that were double labelled (**t, u**). For double labelling, 5 nm (arrowhead) and 10 nm (arrow) gold particles are used for Sns and Duf, respectively. Scale bars: 100 nm (**q–t**) and 15 nm (**u**).

(compare Fig. 3a, b with Fig. 1i, Fig. 3c with Fig. 3d, and Supplementary Fig. 2m, n with Supplementary Fig. 2l). Occasional infoldings do form, but are never bridged by diaphragms (Fig. 3b and Supplementary Fig. 2n). Instead, the nephrocyte surface contains frequent, small patches of electron-dense subcortical material (Fig. 3a,

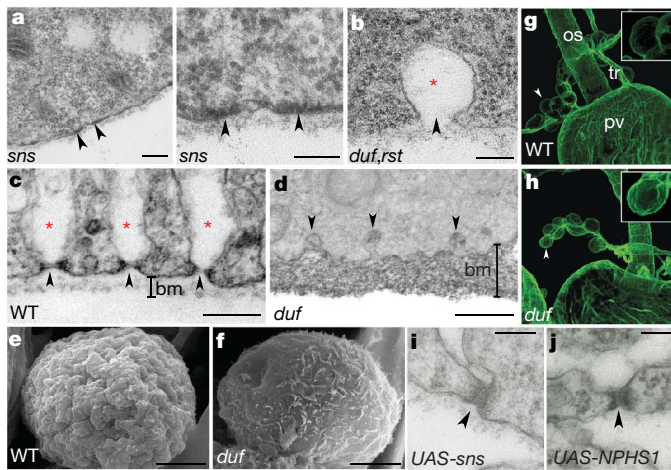


Figure 3 | *Sns* and *Duf* are required for nephrocyte diaphragm formation and normal morphology. **a, b,** *sns* (**a**) and *duf,rst* (**b**) embryonic garland cells lack diaphragms and lacunae. The right image of **a** is a higher magnification image of the left image, showing electron-dense subcortical material (arrowheads). Small lacunae (red asterisk) lacking diaphragms are occasionally found (**b**, arrowhead). **c, d,** Wild-type (WT, **c**) and *duf* (**d**) third instar garland cells. **c,** Diaphragms (arrowheads) and lacunae (red asterisks) densely populate the nephrocyte surface. **d,** *duf* nephrocytes have small lacunae (arrowheads) lacking diaphragms and a substantially thickened basement membrane (bm). **e, f,** Scanning electron micrographs of wild-type (**e**) and *duf* (**f**) third instar garland nephrocytes stripped of basement membrane by collagenase treatment. *duf* nephrocytes lack the furrows corresponding to diaphragm rows. **g, h,** Wild-type (**g**) and *duf* (**h**) Viking–GFP (collagen IV) third instar garland cells, stained with anti-GFP (green), showing greater Viking deposition around *duf* nephrocytes (arrowheads and inset). Garland cell number is also reduced in *duf* larvae, suggesting that mutant cells ultimately die. os, oesophagus; pv, proventriculus; tr, trachea. **i, j,** Diaphragm and foot process morphology are abnormal (arrowheads) in *sns* (**i**) and human *NPHS1* (**j**) embryonic overexpression. Scale bars: 200 nm (**a** (left), **c, d**), 100 nm (**a** (right), **b**), 50 nm (**i, j**) and 5 μ m (**e, f**).

right)—possible remnants of undercoat normally associated with the wild-type diaphragm. These observations indicate that in the absence of the diaphragm, foot processes are unstable and undergo effacement. Scanning electron microscopy reveals the surface smoothing in mutant garland cells (compare Fig. 3e with Fig. 3f). These phenotypes are notably similar to those of podocytes lacking nephrin or NEPH1 (refs 5, 17). Thus, by analogy with nephrin and NEPH1 in the slit diaphragm, we suggest that *Sns* and *Duf* interact through their extracellular domains to form the nephrocyte diaphragm itself.

We noted that the basement membrane in *sns* knockdown and *duf* larval nephrocytes was irregular and markedly expanded (compare Fig. 3c to Fig. 3d). The basement membrane in *duf* nephrocytes has an average depth of 202 nm (± 24 (s.e.m.), $n = 13$), compared with 57 nm (± 4 , $n = 11$) for the wild type. This results from an increase in deposition of the *Drosophila* collagen IV (Viking; Fig. 3g, h and Supplementary Fig. 3). However, this is unlikely to account for the fourfold thickening observed, and we suggest that a further contributing factor is accumulation of haemolymph proteins that clog the basement membrane owing to inefficient filtration.

Given the similarities between the morphology and molecular requirements for podocyte and nephrocyte diaphragms, we tested the ability of human *NPHS1* to rescue the *sns* mutant phenotype. However nephrocytes are sensitive to absolute levels of *Sns*, so even moderate overexpression produced abnormal phenotypes. We therefore compared the effects of overexpressing *Drosophila sns* with those of overexpressing human *NPHS1*. The resulting phenotypes are notably similar, including abnormal nephrocyte foot process morphology and marked thickening of diaphragm filaments (Fig. 3i, j). These data indicate that precise levels of *Sns* are critical for diaphragm formation and,

more importantly, that human nephrin and *Drosophila Sns* function in equivalent ways.

Vertebrate nephrin and NEPH1 form a multi-protein complex at the slit diaphragm with zonula occludens-1 (ZO-1)²⁰, CD2-associated protein (CD2AP)^{21,22} and podocin²³ (Supplementary Table 1). Mutations in these genes result in kidney disease^{21,23,24}. We asked whether the fly orthologues (Supplementary Table 1) contribute to the nephrocyte diaphragm. *In situ* hybridization reveals that *pyd* (the orthologue of ZO-1), *CG31012* (CD2AP) and *Mec2* (*NPHS2*/podocin, Supplementary Fig. 4) are expressed in nephrocytes (Fig. 4a–f). Furthermore, *Pyd*–GFP (green fluorescent protein) precisely co-localizes with *Duf* to the membrane (Fig. 4g), mirroring co-localization of ZO-1 and NEPH1 in the podocyte²⁰.

Molecular interactions between these vertebrate slit-diaphragm-associated proteins have been established (Fig. 4h, black arrows)^{11,20,22,25}. To test whether fly orthologues form a similar complex, we performed a yeast two-hybrid analysis with *Sns* and *Duf* intracellular domains (Fig. 4i). *Sns* interacts with *Mec-2* (podocin) and *Duf* interacts with *Pyd* (ZO-1) (Fig. 4j). An interaction between *Duf* and *Pyd* was independently confirmed by co-immunoprecipitation (Fig. 4k). A previous report established direct association between *Sns* and *Duf*²⁶. These interactions between the fly proteins (Fig. 4h, red arrows) closely resemble those described for slit-diaphragm-associated proteins (Fig. 4h, black arrows). These data, taken together with those described above, provide strong evidence that the nephrocyte diaphragm (Fig. 4l) and slit diaphragm are molecularly homologous structures.

Insect nephrocytes are size- and charge-selective in their sequestration of materials from the haemolymph. Selectivity is based on the characteristics of the diaphragm and basement membrane, which act together as a filtration barrier^{7,9}. To test the filtration capacity of the *Drosophila* nephrocyte diaphragm, we assayed the passage of fluorescently labelled dextrans of different sizes. If the nephrocyte diaphragm acts as a size-selective filter, we reasoned that, like the vertebrate slit diaphragm²⁷, it would allow free passage of small (molecular mass of 10,000 Da) but exclude large (molecular mass of 500,000 Da) dextrans (Fig. 5b). In agreement with our expectations, uptake of the 500,000 Da dextran in wild-type nephrocytes is significantly lower than that of the 10,000 Da dextran (1:3.6, $n = 20$; Fig. 5a, f). These data strongly suggest that the nephrocyte diaphragm functions as a size-based filtration diaphragm (endocytosis from foot process tips could account for low levels of large dextran uptake, Fig. 5b). We anticipated higher uptake of the large dextran in immunoglobulin-domain mutant nephrocytes because they lack diaphragms. However, although the level of uptake of the small dextran in *duf* or *sns* nephrocytes is unaltered compared to wild type, we found a marked reduction in large dextran uptake (Fig. 5c, d, f); the large-to-small ratio is 1:22.5 ($n = 20$) for *duf* and 1:15.3 ($n = 19$) for *sns*. Instead, the large dextran appears as a halo surrounding the cell (Fig. 5c, d). The thickening of basement membrane observed in *duf* nephrocytes (Fig. 3d) could explain the exclusion of the large dextran (Fig. 5e). This highlights a further parallel between nephrocytes and podocytes. An endocytosis-based clearance mechanism in podocytes prevents clogging of the glomerular basement membrane with blood plasma proteins; the slit-diaphragm-associated protein CD2AP has been implicated in this process^{24,28}. We suggest that an equivalent clearance mechanism exists in nephrocytes, and that this mechanism requires *Sns* and *Duf*.

Whatever the causes of reduction in filtration capability, the animal's haemolymph physiology will be disturbed. We tested this hypothesis by feeding larvae silver nitrate, a toxin endocytosed and concentrated in nephrocytes (Fig. 5h). At low concentrations of silver nitrate, viability of control larvae is not compromised (82% eclose as adults, Fig. 5i), but *duf* larvae show a greatly reduced viability (26% eclose, Fig. 5i). A previous study showed a requirement for nephrocytes in the face of toxic stress²⁹. Our data show that immunoglobulin-domain proteins are essential for this function.

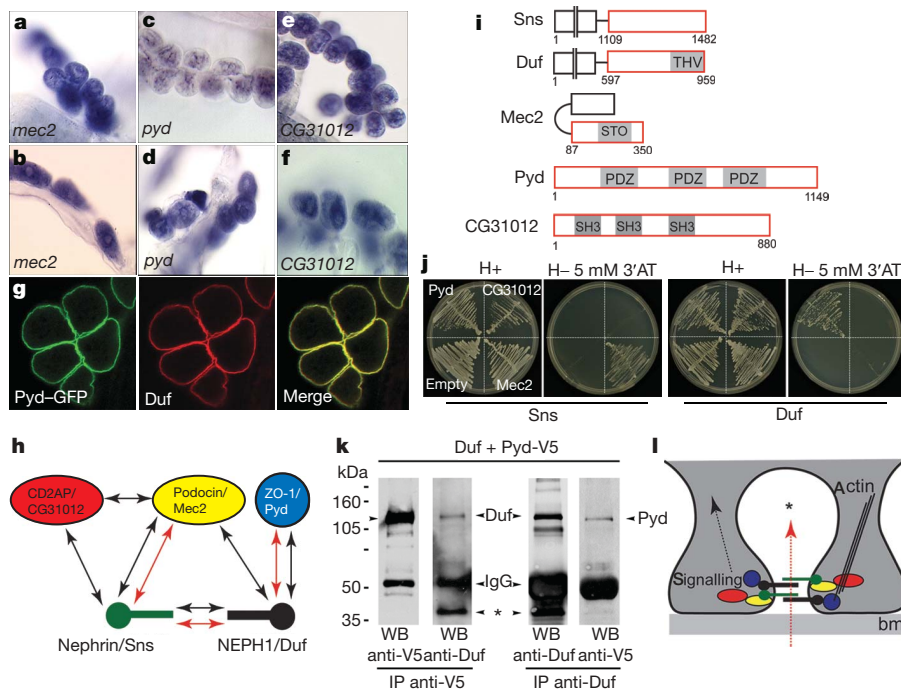


Figure 4 | Analysis of slit-diaphragm-associated protein orthologues in the fly nephrocyte. **a–f**, Third instar garland (**a, c, e**) and pericardial (**b, d, f**) nephrocytes hybridized with probes directed against *Mec2* (**a, b**), *pyd* (**c, d**) and *CG31012* (**e, f**). **g**, *Pyd* (left, green) and *Duf* (centre, red) co-localize (right, yellow) in third instar garland nephrocytes. **h**, Schematic of the main components of the podocyte slit diaphragm (black arrows) and nephrocyte diaphragm (described here and elsewhere, red arrows). **i**, Schematic of *Drosophila* orthologues of slit-diaphragm-associated proteins: PDZ-binding domain (THV), PDZ domain (PDZ), stomatin domain (STO) and SH3 domain (SH3). The region of the protein used in the yeast two-hybrid analysis is outlined in red. **j**, Yeast two-hybrid analysis of

Sns or *Duf* with *Pyd*, *CG31012*, *Mec2* and negative control (empty vector). Direct protein interaction is indicated by growth of yeast on selective media (H – 5 mM 3'AT). **k**, *Duf* and *Pyd*-V5 co-immunoprecipitate with each other from *Drosophila* cells (the unlabelled arrowhead on the left corresponds to *Pyd*; the asterisk indicates cleaved form of *Duf* that is also co-immunoprecipitated with *Pyd*). **l**, Schematic of molecular interactions at the nephrocyte diaphragm; *Sns* (green), *Duf* (black), *Mec2* (yellow), *Pyd* (blue), *CG31012* (red), direction of filtration (red arrow), extracellular lacuna (asterisk). Putative links to signalling or the actin cytoskeleton based on analogy with the equivalent complex at the slit diaphragm are shown. *bm*, basement membrane.

We have highlighted similarities between podocytes and nephrocytes; however, podocytes are an integral part of the nephron (Fig. 1a) whereas the nephrocyte is spatially separated from its renal

(Malpighian) tubule (Fig. 1c). Such differences have contributed to the traditional view that vertebrate and invertebrate excretory systems are unrelated¹. Nevertheless, nephron-like features are present

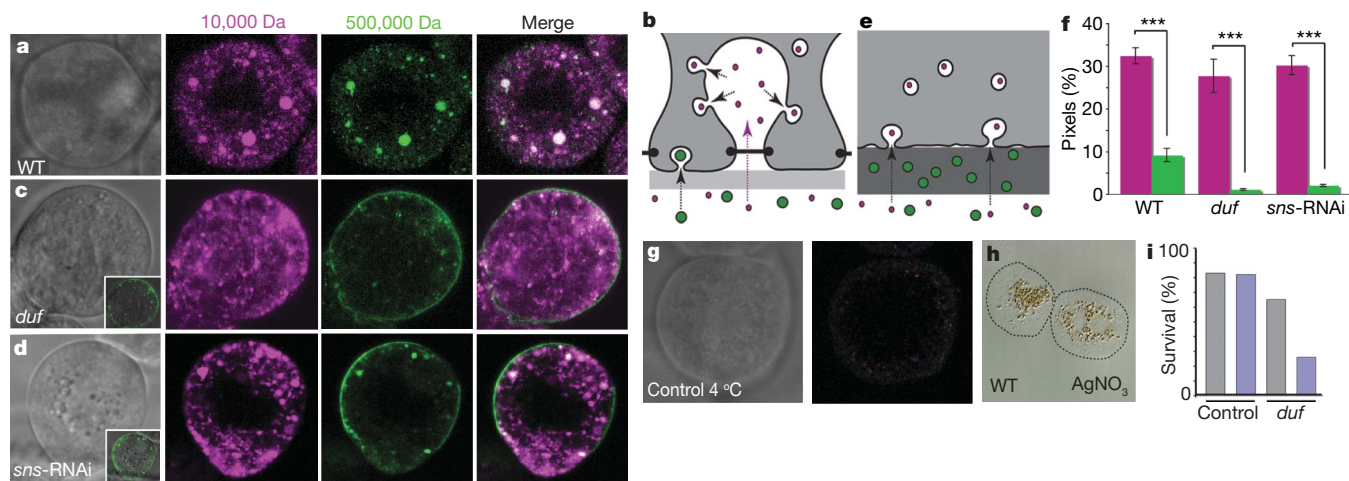


Figure 5 | *Sns* and *Duf* are required for nephrocyte filtration. **a, c, d**, Third instar garland nephrocytes from wild-type (WT, **a**), *duf* (**c**) and *sns*-RNAi knockdown (**d**) animals co-incubated with 10,000 Da (magenta) and 500,000 Da (green) fluorescently labelled dextran. Inset in **c** and **d** shows a merged image of transmitted light and 500,000 Da channels. **b, e**, Schematic drawing of filtration and endocytosis in wild-type (**b**) and *sns* or *duf* mutant (**e**) nephrocytes. **f**, Quantification of small (magenta) and large (green) dextran uptake in wild-type, *duf* and *sns*-RNAi knockdown garland cells. The percentage pixel number exceeding the threshold per unit area is shown on

the y-axis (error bars, s.e.m.). Triple-asterisks indicate significance of $P < 0.001$. Please note, the molar ratio of dye to dextran is 1:1 (for 10,000 Da) and 64:1 (for 500,000 Da). **g**, A control nephrocyte incubated with fluorescent dextran at 4 °C showing no uptake (right image). **h**, Ten-micrometre section of garland nephrocytes from a wild-type larva fed with AgNO_3 (brown granular staining). **i**, The percentage of eclosing sibling control or *duf* adults fed yeast paste (grey) or yeast paste with AgNO_3 (blue; $n = 65, 68, 55$ and 57).

in the excretory systems of a wide variety of invertebrates and in the protochordate *Amphioxus*, suggesting a common origin². The molecular parallels between nephrocytes and podocytes described here support this hypothesis, and it will be of interest to determine whether nephrin- and NEPH1-like protein complexes are found in other invertebrate filtration diaphragms.

Defects in the slit diaphragm complex underlie human diseases for which the unifying feature is proteinuria and kidney failure. These symptoms result from defective filtration, but in addition the nephrin–NEPH1 complex regulates podocyte behaviours such as cell survival, polarity, actin dynamics and endocytosis³⁰. How these functions of the slit diaphragm relate to disease pathologies is currently unclear. The fly nephrocyte also depends on the activity of a nephrin–NEPH1 complex for survival, shape and selective endocytosis, and thus provides a simple and genetically tractable model in which the multiple roles of the slit diaphragm complex can be addressed.

METHODS SUMMARY

Fly strains. Flies were reared on standard food at room temperature (~22 °C), 18 °C or 25 °C. The strains used are listed in the Methods.

Nephrocyte filtration assay. Garland cells were dissected, incubated with AlexaFluor568-dextran (10,000 Da) and fluorescein-dextran (500,000 Da; Molecular Probes) at a concentration of 0.33 mg ml⁻¹ at 25 °C for 5 min, washed on ice, fixed and mounted. Dextran uptake was quantified by counting the pixel number exceeding the background threshold per unit area using Velocity software.

Toxin stress assay. First instar larvae of the appropriate genotype were transferred to agar-only plates supplemented with yeast paste or with yeast paste containing AgNO₃ (2 g yeast in 3.5 ml of 0.003% AgNO₃), and allowed to develop at 25 °C. The percentage of eclosing adults was scored.

Antibodies. Antibodies used were: anti-Sns (1:200, from S. Abmayr), anti-Kirre (1:200, K. Fischbach), anti-Duf extracellular (1:50, M.R.-G.), anti-Duf intracellular (1:500, M.R.-G.), anti-βgal (1:1,000, ICN Biomedicals), anti-HRP (1:200, Jackson ImmunoResearch), anti-pericardin (1:2, DSHB) and anti-GFP (1:500, Invitrogen Molecular Probes).

Confocal and electron microscopy. Confocal and electron microscopy were carried out using standard techniques. For immuno-electron microscopy, dissected larval garland cells were fixed in 4% formaldehyde plus 0.05% glutaraldehyde, embedded in gelatin, cryosectioned, and incubated with anti-Duf extracellular (1:5) or anti-Kirre (1:20) or anti-Sns (1:20) followed by 10 nm (for single stains) or both 5 nm and 10 nm (for double stains) gold-conjugated secondary antibody.

Yeast two-hybrid analysis. The intracellular domains of Sns and Duf were tested for interaction with Pyd (isoform f), CD2AP (SD08724) and the C-terminal cytoplasmic domain of Mec2 using the Clontech Matchmaker GAL4 two-hybrid system. Interaction was indicated by growth in the absence of histidine. 5 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3'AT, Sigma) was included to titrate residual auto-activation from the bait fusion proteins.

Co-immunoprecipitation experiments. *Drosophila* S2 cells transiently co-transfected with pMK33/pMthY-duf and pAC5.1V5-His-pyd were induced for 20 h with 0.7 mM CuSO₄. Total cell lysate was split and each half immunoprecipitated with either anti-V5 or anti-Duf intracellular antibodies and probed with anti-Duf intracellular antibodies and anti-V5 following standard protocols.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 4 August; accepted 8 October 2008.

Published online 29 October 2008.

- Smith, H. W. *From Fish to Philosopher* (Little, Brown, 1953).
- Ruppert, E. E. Evolutionary origin of the vertebrate nephron. *Am. Zool.* **34**, 542–533 (1994).
- Rodewald, R. & Karnovsky, M. J. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J. Cell Biol.* **60**, 423–433 (1974).
- Wartiovaara, J. *et al.* Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J. Clin. Invest.* **114**, 1475–1483 (2004).
- Patrakka, J. *et al.* Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int.* **58**, 972–980 (2000).
- Berridge, M. J. & Oschman, J. L. *Transporting Epithelia* 11–15 (Academic, 1972).
- Crossley, A. C. in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (eds Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I.) 487–515 (Pergamon, 1985).

- Kowalevsky, A. Ein Beitrag zur Kenntnis der Excretions-organe. *Biol. Centralbl.* **9**, 74–79 (1889).
- Locke, M. & Russell, V. W. in *Microscopic Anatomy of Invertebrates* (eds Harrison, F. W. & Locke, M.) 687–709 (Wiley, 1998).
- Kestila, M. *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—nephrin—is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* **1**, 575–582 (1998).
- Sellin, L. *et al.* NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J.* **17**, 115–117 (2003).
- Ruotsalainen, V. *et al.* Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 7962–7967 (1999).
- Gerke, P., Huber, T. B., Sellin, L., Benzing, T. & Walz, G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 918–926 (2003).
- Barletta, G. M., Kovari, I. A., Verma, R. K., Kerjaschki, D. & Holzman, L. B. Nephrin and Nephrin co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J. Biol. Chem.* **278**, 19266–19271 (2003).
- Khoshnoodi, J. *et al.* Nephrin promotes cell–cell adhesion through homophilic interactions. *Am. J. Pathol.* **163**, 2337–2346 (2003).
- Liu, G. *et al.* Nephrin and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J. Clin. Invest.* **112**, 209–221 (2003).
- Donoviel, D. B. *et al.* Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol. Cell Biol.* **21**, 4829–4836 (2001).
- Tepass, U. & Hartenstein, V. The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **161**, 563–596 (1994).
- Rugendorff, A., Younossi-Hartenstein, A. & Hartenstein, V. Embryonic origin and differentiation of the *Drosophila* heart. *Roux Arch. Dev. Biol.* **203**, 266–280 (1994).
- Huber, T. B. *et al.* The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. *J. Biol. Chem.* **278**, 13417–13421 (2003).
- Shih, N. Y. *et al.* Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* **286**, 312–315 (1999).
- Shih, N. Y. *et al.* CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am. J. Pathol.* **159**, 2303–2308 (2001).
- Route, N. *et al.* NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genet.* **24**, 349–354 (2000).
- Kim, J. M. *et al.* CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* **300**, 1298–1300 (2003).
- Schwarz, K. *et al.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J. Clin. Invest.* **108**, 1621–1629 (2001).
- Galletta, B. J., Chakravarti, M., Banerjee, R. & Abmayr, S. M. SNS: Adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in S2 cells and embryonic myoblasts. *Mech. Dev.* **121**, 1455–1468 (2004).
- Kramer-Zucker, A. G., Wiessner, S., Jensen, A. M. & Drummond, I. A. Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. *Dev. Biol.* **285**, 316–329 (2005).
- Akilesh, S. *et al.* Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 967–972 (2008).
- Das, D., Aradhya, R., Ashoka, D. & Inamdar, M. Post-embryonic pericardial cells of *Drosophila* are required for overcoming toxic stress but not for cardiac function or adult development. *Cell Tissue Res.* **331**, 565–570 (2008).
- Huber, T. B. & Benzing, T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **14**, 211–216 (2005).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank F. Evers, Z. Cseresnyes, M. Guerra and E. Salvador for technical assistance, and S. Abmayr, L. Cooley, C. Doe, M. Affolter, K. Fischbach and K. Tryggvason for reagents. We thank V. Hartenstein, M. Inamdar, A. Woolf, I. Miguel-Alíaga, F. Evers, M. Landgraf and members of the Skaer laboratory for discussions, and E. Knust and W. B. Huttner for their support. This work was supported by Wellcome Trust grants awarded to H.S. (072441 and 079221; H.W., B.D. and H.S.); Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB 590 awarded to E. Knust (F.G.) and ARC 1242 (H.W., B.D., H.S. and F.G.); an MEC grant awarded to M.R.-G. (BFU2007-62201; S.P.-S. and M.R.-G.); a Fundación Ramón Areces grant to the CBMSO (M.R.-G.); EC grant LSHG-CT-2004-511978 to MYORES (M.R.-G.); and an FPU fellowship from the MEC awarded to A.G.-L.

Author Contributions B.D., H.S. and M.R.-G. designed and directed the project. B.D., H.W., M.R.-G. and S.P.-S. performed the experiments. F.G. and M.W.-B. provided technical assistance. A.G.-L. and R.A. provided materials. B.D. and H.S. wrote the paper. All authors discussed results and commented on the manuscript.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.S. (hs17@cam.ac.uk).

METHODS

Fly strains. The following fly genotypes were used: OregonR (wild-type strain); *sns*^{X^{BB}} and *UAS-sns* (gift from S. Abmayr); *Df(1)w^{67k30}* hemizygotes for embryonic analysis of *duf*; *Df(1)w^{67k30}/Df(1)N⁵⁴¹⁹* transheterozygotes or *Df(1)duf^{ps-1}* (small deficiency removing the *duf* locus only, a description of this allele will be published elsewhere, S.P.-S. *et al.*, in preparation) for larval analysis of *duf*; *rP298* (*duf-LacZ*); *UAS-Pyd-GFP* (gift from M. Affolter); *Viking-GFP* (gift from L. Cooley); *UAS-sns-RNAi* (a 1,047 bp fragment was obtained by PCR from *sns* complementary DNA using primers 5'-CCAGTTCGTATAATGACACCG-3' and 5'-CCTACAGCTATACGAGGTGTC-3' and used to make intron-spliced hairpin RNA according to ref. 31); *UAS-NPHS1* (human *NPHS1* cDNA, gift from K. Tryggvason, cloned into pUAST); *G447.2-GAL4* (embryonic garland cell driver; gift from R. Reuter); and *Prospero-Gal4* (larval garland cell driver; gift from C. Doe). Fly crosses were maintained at 25 °C except for the overexpression experiment in which animals were maintained at 29 °C to ensure maximum transgene expression. Marked balancer chromosomes (Krüppel-Gal4, UAS-GFP) and/or PCR genotyping³² from carcasses remaining after dissection were used to identify appropriate genotypes.

Nephrocyte filtration assay. Garland nephrocytes (including a small portion of oesophagus and the proventriculus) were dissected from third instar larvae in Shields and Sang medium (Sigma), and were then transferred to media containing AlexaFluor568-dextran (10,000 Da) and fluorescein-dextran (500,000 Da; Molecular Probes) at a concentration of 0.33 mg ml⁻¹, and incubated at 25 °C for 5 min. The cells were washed on ice for 10 min in cold PBS, fixed in 4% formaldehyde for 10 min at room temperature (~22 °C), rinsed once in PBS and then mounted in vectashield (Vector labs). All post-dissection procedures were carried out in the dark. A single confocal section of the cell midpoint was taken using a Leica SP1 confocal microscope, and dextran uptake was quantified by counting the pixel number exceeding the background threshold per unit area using Volocity software. The average fluorescence from the proventriculus epithelium (where dextran uptake does not occur) was used to set the background threshold. The same threshold was used for all experiments. Control cells incubated with dextran on ice showed no uptake. Results were analysed statistically using the Shapiro–Wilk normality test followed by the paired *t*-test or Kruskal–Wallis Rank Sum test as appropriate.

Toxin stress assay. Flies of the appropriate genotype were allowed to lay on standard apple juice plates supplemented with yeast. After approximately 24 h, freshly emerging first instar larvae from this plate were transferred to agar-only plates supplemented with yeast paste or with yeast paste containing AgNO₃ (2 g

yeast in 3.5 ml of 0.003% AgNO₃), and allowed to develop at 25 °C. The percentage of eclosing adults was scored.

In situ hybridization and immunohistochemistry. Whole-mount *in situ* hybridization and immunohistochemistry to embryos and third instar nephrocytes were carried out using standard techniques. Antibodies used were: anti-Sns (1:200, gift from S. Abmayr), anti-Kirre (1:200, gift from K. Fischbach), anti-Duf extracellular (1:50), anti-Duf intracellular (1:500, the generation of both antisera will be published elsewhere), anti-βgal (1:1,000, ICN Biomedicals), anti-HRP (1:200, Jackson ImmunoResearch), anti-pericardin (1:2, DSHB), anti-GFP (1:500, Invitrogen Molecular Probes), AlexaFluor 488 phalloidin and AlexaFluor 568 phalloidin (1:20, Invitrogen Molecular Probes), and TOTO3 and TO-PRO-3 (1:100, Invitrogen Molecular Probes).

Confocal and electron microscopy. Confocal microscopy, transmission electron microscopy and scanning electron microscopy were carried out using standard techniques. For immuno-electron microscopy, dissected garland cells were fixed in 4% formaldehyde plus 0.05% glutaraldehyde, embedded in gelatin, and cryosectioned and incubated with anti-Duf extracellular (1:5), anti-Kirre (1:20), or anti-Sns (1:20) followed by 10 nm (for single stains) or both 5 nm and 10 nm (for double stains) gold-conjugated secondary antibody. In some cases, confocal images correspond to z-projections from a series of confocal sections.

Collagenase treatment. Third instar garland cells were incubated in 0.1% collagenase type I in PBS for 3 min at 37 °C.

Yeast two-hybrid assays. The intracellular domains of Sns and Duf were used as bait (cloned into pGBKT7, Clontech) and tested for interaction with Pyd (isoform f), CD2AP (SD08724), and C-terminal cytoplasmic domain of Mec2 (all cloned into pGADT7, Clontech). Interaction was indicated by growth in absence of histidine. 5 mM 3'AT (Sigma) was included to titrate residual auto-activation from the bait fusion proteins.

Co-immunoprecipitation experiments. *Drosophila* S2 cells transiently co-transfected with pMK33/pMtHy-duf and pAC5.1V5-His-pyd were induced for 20 h with 0.7 mM CuSO₄. Total cell lysate was split and each half immunoprecipitated with either anti-V5 or anti-Duf, and probed consecutively with anti-Duf and anti-V5 or anti-V5 and anti-Duf, respectively, following standard protocols.

31. Nagel, A. C., Maier, D. & Preiss, A. Green fluorescent protein as a convenient and versatile marker for studies on functional genomics in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* **212**, 93–98 (2002).
32. Strunkelberg, M. *et al.* *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* **128**, 4229–4239 (2001).